



EESTI MAAÜLIKOOL
Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut

Irma Laas

**MIKROOBIDE ELULEMUSE HINDAMINE
LÜOFILISEERITUD TATRALEIVAJUURETISTES**

**EVALUATION OF MICROBIAL SURVIVAL IN FREEZE-
DRIED BUCKWHEAT SOURDOUGHS**

Bakalaureusetöö
Toiduainete tehnoloogia õppekava

Juhendaja: nooremteadur Liis Lutter, *MSc*
teadur Mirjam Vallas, *PhD*

Tartu 2021

Eesti Maaülikool		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51006			
Autor: Irma Laas		Õppekava: Toiduainete tehnoloogia	
Pealkiri: Mikroobide elulemuse hindamine lüofiliseeritud tatrakeivajuuretes			
Lehekülgi: 81	Jooniseid: 21	Tabeleid: 4	Lisasid: 2
<p>Õppetool: Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool</p> <p>ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 1.7 Toiduteadused, Toiduainete ja jookide tehnoloogia T430</p> <p>Juhendaja: nooremteadur Liis Lutter, MSc; teadur Mirjam Vallas, PhD</p> <p>Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu 2021</p>			
<p>Traditsioonilisel meetodil valmistatud keivajuurete kasutamine leiva tootmiseks on keerukas ja aeganõudev protsess, kuna juurete metaboolselt aktiivsena hoidmine eeldab pidevat juurete uuendamist. Sellest tulenevalt on väiketootjatel tarbijatele aktiivse keivajuurete turustamine raskendatud. Lahendusena nähakse keivajuurete kuivatamist, mis aitab tagada mikroobikultuuride stabiilsust nende pikaajalisel säilitamisel. Samas võib kuivatamine negatiivselt mõjuda mikroobide elulemusele ja tehnoloogilistele omadustele. Vaatamata laiapõhjalistele teadusuuringutele on mikroobide elujõu parendamine ja säilitamine endiselt suureks väljakutseks. Kommertsiaalsed keivajuured saadakse juurete kuivatamisel kõrgetel temperatuuridel, mistõttu ei jää sellise töötuse käigus mikroorganismid elama. Alternatiivne kuivatusemeetod keivajuurete pikemaajaliseks säilitamiseks on külmuivatamine, kuid vähe on kirjeldatud selle meetodi mõju juures leiduvatele mikroobidele.</p>			
<p>Bakalaureusetöö eesmärk oli nii teaduskirjanduse kui ka eksperimentaalse töö alusel anda ülevaade tatrakeivajuures esinevatest mikroobidest ning tuvastada lüofiliseerimise ja krüoprotektantide mõju mikroobide elulemusele lüofiliseeritud tatrakeivajuures.</p>			
<p>Töö raames teostati mikrobioloogilised ja füüsikalise-keemilised analüüsid käsitööstuslikust tatrakeivajuuretest ning lisa starterkultuure (<i>Lactobacillus fermentum</i>, <i>Leuconostoc mesenteroides</i>) sisaldavatest tatrakeivajuuretest. Fermenteeritud tatrakeivajuurete lüofiliseerimisel kasutati kahe krüoprotektandi kombinatsiooni, millest</p>			

ühel on tuvastatud kaitsev toime piimhappebakteritele ja teisel pärmseentele. Mikrobioloogilised analüüsid teostati juuretistest lüofiliseerimisjärgselt ja lüofiliseeritud juuretistest, mida oli säilitatud üks kuu kahel erineval säilitustemperatuuril (+4 °C ja +25 °C). Tuvastamaks, kas krüoprotektante ja starterkultuure sisaldaval tatrleivajuuretistel on mõju tatrleiva omadustele, viidi läbi tatrleibade sensoorne analüüs.

Bakalaureusetöö tulemusena selgus, et tatrleivajuureliste mikroobses koosluses esines peamiselt *Lactobacillus* ja *Saccharomyces* perekonda kuuluvaid mikroobe. Piimhappebakterite ja pärmseente elulemus säilis paremini juuretistes, mille lüofiliseerimisel kasutati krüoprotektiivseid aineid. Krüoprotektantidest tagas kõrgema kaitse mikroobide elulemusele trehaloosi ja sahharoosi kombinatsioon. Lisatud starterkultuurid ja krüoprotektiivsed ained ei avaldanud mõju tatrleibade sensoorsetele omadustele.

Märksõnad: tatrleivajuuretis, fermentatsioon, starterkultuurid, külmuivatamine, krüoprotektandid

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51006		Abstract of Bachelor's Thesis	
Author: Irma Laas		Curriculum: Food Technology	
Title: Evaluation of microbial survival in freeze-dried buckwheat sourdoughs			
Pages: 81	Figures: 21	Tables: 4	Appendixes: 2
Chair: Chair of Food Science and Food Technology Field of research and (CERC S) code: Food and drink technology T430 Supervisors: junior researcher Liis Lutter, MSc; researcher Mirjam Vallas, PhD Place and date: Tartu 2021			
<p>Traditional method of sourdough production for bread manufacturing is a complex and time-consuming process, as keeping the sourdough metabolically active requires constant back-slopping of the sourdough. As a result, it is complicated for small bussinesses to market active sourdough. The solution is to dry sourdough which helps to ensure the stability of microbial cultures during their long-term storage. However drying can adversely affect the viability and technological properties of microbes. Despite extensive research to improve and maintain microbial viability, there are major challenges. Commercial dry sourdoughs are obtained by drying the sourdough at a high temperature that does not contain such treatment for microorganisms to live. An alternative drying method for long-term storage of sourdough is freeze-drying but little information is available about how it affects the microbial survival.</p> <p>The aim of the Bachelor's thesis was to provide an overview of the microbes present in buckwheat sourdough and to identify the effect of lyophilization and cryoprotectants on the microbial survival in lyophilized buckwheat sourdough on the basis of both scientific literature and experimental work.</p> <p>Microbiological and physico-chemical analyzes were performed on artisanal buckwheat sourdoughs and buckwheat sourdoughs containing additional starter cultures (<i>Lactobacillus fermentum</i>, <i>Leuconostoc mesenteroides</i>). A combination of two cryoprotectants was used to lyophilize the fermented buckwheat sourdoughs, one of which has been shown to have a protective effect on lactic acid bacteria and the other on yeasts.</p>			

Microbiological analyzes were performed on sourdoughs after lyophilization and on lyophilized sourdoughs stored for one month at two different storage temperatures (+4 °C and +25 °C). Sensory analysis of buckwheat breads were performed to determine whether buckwheat sourdough containing cryoprotectants and starter cultures have an effect on buckwheat bread properties.

As a result of the Bachelor's thesis, it became clear that the microbial community of buckwheat sourdoughs contained mainly microbes belonging to the families *Lactobacillus* and *Saccharomyces*. The survival of lactic acid bacteria and yeasts was better preserved in sourdough lyophilized using cryoprotective agents. Of the cryoprotectants, the combination of trehalose and sucrose provided higher protection for microbial survival. The added starter cultures and cryoprotective agents did not affect the sensory properties of buckwheat breads.

Keywords: buckwheat sourdough, fermentation, starter cultures, freeze-drying, cryoprotectants

SISUKORD

LÜHENDID.....	8
SISSEJUHATUS	10
1. KIRJANDUSE ANALÜÜS	12
1.2.1. Tatar.....	13
1.2.2. Tatrajahu	14
1.3. Leivajuuretise mikrobiota.....	15
1.3.1. Leivajuuretise tooraine mikrobiota.....	15
1.3.2. Piimhappebakterid leivajuuretis.....	16
1.3.3. Pärmseened leivajuuretis.....	17
1.3.4. Tatrалеivajuuretise mikrobiota.....	18
1.3.5. Leivajuuretise mikroobide metabolism.....	18
1.4. Külmuuivatamine	20
1.4.1. Külmuuivatamise tehnoloogia.....	21
1.4.2. Leivajuuretise külmuuivatamine	22
1.5. Krüoprotektandid.....	22
1.5.1. Krüoprotektantide klassifitseerimine.....	24
1.5.2. Piimhappebakteritele sobivad krüoprotektandid	28
1.5.3. Pärmseentele sobivad krüoprotektandid.....	29
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	31
2.1. Töö eesmärk ja ülesanded.....	31
2.2. Materjal ja metoodika	31
2.2.1. Uuritav materjal	31
2.2.2. Tatrалеivajuuretisete fermenteerimine.....	32
2.2.3. Tatrалеivajuuretisete lüofiliseerimine.....	32
2.2.4. Mikrobioloogilised analüüsid	34
2.2.4.1. Proovide ettevalmistus mikrobioloogilisteks analüüsideks.....	34
2.2.4.2 Mikrobioloogilised külvid	34
2.2.4.3. Mikroobide pesa- ja rakumorfoloogia	35
2.2.4.4. Mikroobide identifitseerimine MALDI-TOF MS meetodil	36
2.2.5 Füüsikalise-keemilised analüüsid.....	36
2.2.5.1. Aktiivhappesus ja tiitritav happesus	36
2.2.5.2. Vee aktiivsus.....	37
2.2.5.3. Kuivainesisaldus	37
2.2.6. Tatrалеibade valmistamine.....	37
2.2.7. Tatrалеibade sensoorne analüüs	37
2.2.8. Andmete statistiline analüüs	38
3. TULEMUSED JA ARUTELU	39
3.1. Mikrobioloogiliste külvide tulemused.....	39
3.1.1. Bakterite üldarv tatrалеivajuuretisetes	39

3.1.2. Hallitus- ja pärmseente üldarv tatrалеivajuuretistes.....	41
3.1.3. Piimhappebakterid tatrалеivajuuretistes.....	45
3.1.3.1. Aeroobsete piimhappebakterite üldarv tatrалеivajuuretistes.....	45
3.1.3.2. Mikroaeroobsete piimhappebakterite üldarv tatrалеivajuuretistes.....	49
3.1.3.3. Anaeroobsete piimhappebakterite üldarv tatrалеivajuuretistes.....	53
3.1.5. <i>Coli</i> -laadsed tatrалеivajuuretises.....	57
3.1.6. Tatrалеivajuuretest isoleeritud mikroobid.....	57
3.2. Füüsikalise-keemiliste analüüside tulemused	60
3.3. Tatrалеiva sensoorse hindamise tulemused.....	61
KOKKUVÕTE	67
KASUTATUD KIRJANDUS.....	70
LISAD	77
Lisa 1. Sensoorse analüüsi hindamise leht	78
Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta	80

LÜHENDID

FTJ – fermenteeritud tatraleivajuuretis

FTJ-B12 – fermenteeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora B12

FTJ-BLN1 – fermenteeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora BLN1

log PMÜ/g – kümnendlogaritm pesasid moodustavast ühikust grammi kohta

LTJ – lüofiliseeritud tatraleivajuuretis

LTJ-B12 – lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora B12

LTJ-B12+MM – maltoosi ja maltodekstriini sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora B12

LTJ-B12+TS – trehaloosi ja sahharoosi sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora B12

LTJ-BLN1_{MM} – kontrolljuuretis maltoosi ja maltodekstriini sisaldavale lüofiliseeritud tatraleivajuuretile starterkultuuriga Lyoflora BLN1

LTJ-B12_{MM} – kontrolljuuretis maltoosi ja maltodekstriini sisaldavale lüofiliseeritud tatraleivajuuretile starterkultuuriga Lyoflora B12

LTJ-BLN1_{TS} – kontrolljuuretis trehaloosi ja sahharoosi sisaldavale lüofiliseeritud tatraleivajuuretile starterkultuuriga Lyoflora BLN1

LTJ-B12_{TS} – kontrolljuuretis trehaloosi ja sahharoosi sisaldavale lüofiliseeritud tatraleivajuuretile starterkultuuriga Lyoflora B12

LTJ-BLN1 – lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora B12

LTJ-BLN1+MM – maltoosi ja maltodekstriini sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora BLN1

LTJ-BLN1+TS – trehaloosi ja sahharoosi sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora BLN1

LTJ+MM – maltoosi ja maltodekstriini sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis

LTJ+TS – trehaloosi ja sahharoosi sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis

LTJ_{MM} – maltoosi ja maltodekstriini sisaldava lüofiliseeritud tatraleivajuuretile kontrolljuuretis

LTJ_{TS} – trehaloosi ja sahharoosi sisaldava lüofiliseeritud tatraleivajuuretile kontrolljuuretis

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization–time of flight, ingl. k.) – maatriksainega vahendatud ioniseerival kiirgusel (laseril) põhinev desorptsioon-ioniseerimine (maatriksmahitatud laserdesorbtsioon-ionisatsioon) - “lennuaja-detektor”

MRS – sööde laktobatsillide kasvatamiseks

PMÜ/g – pesasid moodustavad ühikud grammi kohta

TSA – universaalsööde mikroobide kasvatamiseks

SISSEJUHATUS

Leivajuuretis on vee ja jahu segu, mida on kääritatud tooraines ja keskkonnas looduslikult leiduvate piimhappebakterite ja pärmseentega. Traditsiooniline leivajuuretise fermentatsioon on pikaajaline protsess ning sel viisil valmistatud leival on üldiselt eripärane tekstuur ning iseloomulik lõhn ja maitse, mis on peamiselt seotud leivajuuretise mikroobse koosluse ja tehnoloogiliste parameetritega. Juuretise mikroobse koosluse säilitamise eesmärgil eelistavad pagariettevõtted leivajuuretist säilitada madalatel temperatuuridel või kuivatatult. Üks võimalus leivajuuretiste pikemaks säilitamiseks on külmkuivatamine. Külmkuivatatud leivajuuretis on värske juuretisega võrreldes mitmeid eeliseid, sealhulgas pikem säilivusaeg ja toote stabiilsem kvaliteet. Samuti säilib sel viisil mikroobne kooslus, mis on iseloomulik iga pagariettevõtte leivajuuretisele. Samas võib külmkuivatamine negatiivselt mõjuda mikroobide elujõulisusele ja tehnoloogilistele omadustele. Selleks, et kaitsta rakke kahjustuste eest võib lisada enne külmkuivatamist kuivatamiskeskonda krüoprotektiivseid aineid, et minimeerida tekkivate jääkristallide ning külmutamisel kasutatava madala temperatuuri kahjulikku mõju mikroobirakkudele.

Nüüdisajal muutuvad järjest populaarsemaks gluteenivabad pagaritooted, mida saaksid tarbida gluteenitalumatuse ehk tsöliaakia all kannatavad inimesed. Üks võimalus on gluteeni sisaldavate jahude, nt. rukki- ja nisujahu, asemel kasutada pagaritoodete valmistamisel tatrajahu. Tatrajahu on valgu- ja kiudainerikas, sisaldab erinevaid mineraalaineid ja B-grupi vitamiine. Kuigi tatar on väärtuslik tooraine leiva valmistamiseks, on siiski vähe informatsiooni tatraleivajuuretises esinevate piimhappebakterite ja pärmseente ning nende biokeemiliste ja funktsionaalsete omaduste kohta.

Bakalaureusetöö eesmärk on nii teaduskirjanduse kui eksperimentaalse töö alusel anda ülevaade tatraleivajuuretistes esinevatest mikroobidest ning tuvastada Lüofiliseerimise ja krüoprotektantide mõju mikroobide elulemusele Lüofiliseeritud tatraleivajuuretistes. Eksperimentaalses osas viidi läbi tatraleivajuuretise fermentatsiooni ja Lüofiliseerimise katsed, milles kasutati erinevate krüoprotektantide kombinatsioone. Lüofiliseerimisjärgselt hinnati mikroobide elulemust külmkuivatatud tatraleivajuuretistes. Lüofiliseeritud

tatralaivajuuretest küpsetati tatralaivad ning hinnati sensoorselt krüoprotektantide ja starterkultuuride mõju tatralaiva organoleptilistele omadustele.

1. KIRJANDUSE ANALÜÜS

Leivajuuretis on teraviljajahu ja vee segu, mida on kääritatud piimhappebakterite ja pärmseentega (Stefanello *et al.* 2018: 510). Inimkonnale teadaolevalt on leivajuuretise fermentatsioon üks vanemaid teravilja kääritamisprotsesse, mille põhifunktsioon on leivataina hapestamine (Cappelle, Decock 2005: 113). Leivajuuretise näol on tegemist keeruka ökosüsteemiga, milles mikroobide elutegevuse tulemusena toimuvad mitmed biokeemilised protsessid, nt. hapendamine, proteolüüs ja lipolüüs ning ensüümide, seenvastaste ühendite ja eksopolüsahhariidide süntees (Jakob *et al.* 2017: 95).

Leivajuuretist iseloomustab madal pH (3,5-4,5) ja hapnikusisaldus, kõrge süsivesikute kontsentratsioon ning piimhappebakterite kõrgem arvukus ($>10^8$ PMÜ/g) võrreldes pärmseentega ($<10^7$ PMÜ/g) (Tamani *et al.* 2013: 247; Stefanello *et al.* 2018: 510). Leivajuuretise mikroobne kooslus ja selle stabiilsus sõltub mitmetest teguritest, nt. toorainest (jahu, joogivesi jm lisandid), tootmiskeskkonnast, fermentatsiooni temperatuurist, juuretise värskendamisetappide arvust ja säilitustemperatuurist jne. Eeltoodud parameetrite mõju leivajuuretise pidevale uuendamisele on aluseks iseloomuliku piimhappebakterite ja pärmseente koosluse kujunemisel ning takistab samal ajal teiste mikroorganismide paljunemist, mis pärinevad toorainest või tootmiskeskkonnast (De Vuyst, Neysens 2005: 44).

Leivajuuretise fermentatsiooni tulemusena paranevad leivataina omadused nagu tekstuur, maitse ja toiteväärtus. Peale selle võimaldab kääritamine kaitsta leiba hallituse tekke ja bakteriaalse riknemise eest, kuna leivajuuretises esinevad mikroobid on suutelised tootma fermentatsiooni käigus seenvastaseid ühendeid ja bakteriotsiine. Lisaks sellele on juuretisega valmistatud leival parem toiteväärtus tänu mineraalainete kõrgemale bioaktiivsusele ja madalamale glükokeemilisele indeksile (De Vuyst, Vancanneyt 2007: 120; Siepmann *et al.* 2018: 243).

1.2. Tatraleivajuuretis

Nüüdisajal on toiduainetööstuses pööratud suurt tähelepanu gluteenivabade toodete, eelkõige pagaritoodete, arendamisele. Gluteenivabade toodete suurenevat nõudlust on põhjustanud tsöliaakiahaigete kasv ja toitumistrend, mis on seotud toidumenüüst allergeenvalkude kõrvalejätmisega. Gluteeni, mis koosneb gliadiinist ja gluteniinist, leidub teraviljades, näiteks nisus, rukkis, speltanisis ja odras (Wieser, 1996: 3-4). Teatud inimeste organism ei suuda gluteeni üldse seedida (Armstrong *et al.* 2012: 104-105; Fritz, Chen, 2017: 360). Tsöliaakia ehk gluteenitalumatus on krooniline peensoole immuunvahendatud enteropaatia, mis on põhjustatud geneetilise eelsoodumusega inimestel toidugluteeniga kokkupuutel ning mille sümptomiteks on väsimus, kõhuvalu ja kõhulahtisus ning imendumishäiretega kaasnev kiire kehakaalu langus (Gao *et al.* 2018: 19-20).

Traditsiooniliste pagaritoodete tootmine hõlmab nelja etappi: koostisainete segamine, taina valmistamine, kääritsemine ja küpsetamine. Gluteenil on kõigis nendes tehnoloogilistes etappides oluline roll (Zhou *et al.* 2014: 5-7), mistõttu võidakse gluteenivabade pagaritoodete välimust, maitset, aroomi ja tekstuuri hinnata vähem meeldivamaks. Lihtsaim viis gluteenivabade toodete tekstuuri parandamiseks on kasutada nisujahu asendajaid (nt. riis, mais, sorgo, tatar, amarant, kinoa, mais, kikerhernes) (Arendt, Moore, 2006: 473-475; Rocha Parra *et al.* 2015; 683). Näiteks kasutatakse riisijahu lääneriikides laialdaselt neutraalse maitse ja kahvatu värvi tõttu, mis võimaldab seda kergemini lisada paljudesse toodetesse, ilma et see mõjutaks märkimisväärselt toote omadusi. Viimastel aastatel on uuringud keskendunud uudse toorme uurimisele, nt. tatra-, kinoa-, amarant- ja teff jahust pagaritoodete valmistamisele. Enamasti on need jahud toitumisaspektist tasakaalustatumad kui maisi- või riisijahu või täiendused. Pealegi on neil jahudel kõrgem valgusisaldus, kiudainete, vitamiinide ja mineraalide sisaldus. (Alvarez-Jubete *et al.* 2010: 440-445; Mezaize *et al.* 2010: 2186-2189)

1.2.1. Tatar

Tatar (*Fagopyrum esculentum*) on üheaastane põllukultuur, mis kuulub teraviljaliste hulka, kuid selle vili on tegelikult päikel. Enamlevinud on kahe tatraliigi kasvatamine: harilik tatar

(*Fagopyrum esculentum*) ja idatatar (*Fagopyrum tartaricum*) (Christa, Soral-Šmietana 2008: 153).

Tatraterad on kiudainete ja vees lahustuvate kiudainete allikad (Christa, Soral-Šmietana 2008: 153-154). Tatraterade peamise koostisosa (58–73%) moodustavad seeditavad süsivesikud, mida leidub peamiselt tärglase kujul (tärglase sisaldus 59-70% kuivaines). Tatraterad sisaldavad 7,0-10,9% kiudaineid, mis on vabad antitoitainest fütiinhappest (Tömösközi, Langó 2017: 163).

Tatraterade valgusisaldus on 12% (Tömösközi, Langó 2017: 164). Tatra valkude aminohappeline koostis on hästi tasakaalustatud ja kõrge bioloogilise väärtusega, ehkki valkude seeduvus on suhteliselt madal (Christa, Soral-Šmietana 2008: 153-154). Tatraterade aminohappeline koostis on mitmekülgne, sisaldades inimesele asendamatuid aminohappeid nagu lüsiin, treoniin ja valiin. Tatraterade glutamiini ja proliini sisaldus on madal, mistõttu sobib tatar tarbimiseks tsöliaakia all kannatavatele inimestele (Torbica *et al.* 2012: 277; Tömösközi, Langó 2017: 164). Tatravalgud koosnevad peamiselt globuliinidest (kuni 50%) ja albumiinidest (madala molekulmassiga ahelaga polüpeptiidid, umbes 25%) (Christa, Soral-Šmietana 2008: 153-154).

Tatar sisaldab rohkest vitamiine, eriti B-grupi vitamiine, mille keskmised sisaldused on järgmised: vitamiin B₁ (3,3 mg/kg), B₂ (10,6 mg/kg), B₃ (18,0 mg/kg), B₅ (11,0 mg/kg) ja B₆ (1,5 mg/kg) (Christa, Soral-Šmietana 2008: 153-154; Tömösközi, Langó 2017: 166). Tatraterad on olulised mikroelementide (tsink, vask, mangaan, seleen) ja makroelementide (kaalium, naatrium, kaltsium, magneesium) allikaks. Rutiini, katehhiinide ja muude polüfenoolide märkimisväärne sisaldus ning nende potentsiaalne antioksüdatiivne toime on oluline ka toiduväärtuse seisukohalt. (Christa, Soral-Šmietana 2008: 153-154)

1.2.2. Tatrajahu

Tatrajahu sisaldab sõltuvalt jahutüüpidest 70–91 massiprotsenti tärglist ning tärglis koosneb 25% amüloosist ja 75% amülopektiinist (Takahama *et al.* 2011: 13). Tatrajahu veeimendumisvõime on kõrgem võrreldes nisujahuga, mis on tingitud tatrajahu suuremast lipiidide ja kiudainesisaldusest (Tömösközi, Langó 2017: 171). Valgusisaldus tatrajahus on madalam (ca. 8,51-18,87% olenevalt tatra sordist) kui kaerajahus, kuid oluliselt kõrgem kui

riisi-, nisu-, hirsi-, sorgo- ja maisijahus. Tatrajahu saab valmistamisel ja töötlemisel hõlpsasti kombineerida teiste koostisosadega, et valmistada tatart sisaldavaid toiduaineid, näiteks erinevaid pagaritooteid sh leiba, nuudleid, veini jms. Tatrajahu käitumine sarnaneb tavalise teraviljajahuga, kuid see ei sisalda gluteeni. (Krkoskova, Mrazova 2005: 563, 566)

1.3. Leivajuuretise mikrobiota

Leivajuuretises leiduv mikrobiota koosneb tavaliselt piimhappebakteritest ja pärmseentest. Leivajuuretise mikrobiootat mõjutavad tehnoloogilised parameetrid (nt. fermentatsiooniaeg ja -temperatuur), endogeensed tegurid, nagu kasutatud teraviljajahu tüüp ja kvaliteet ning piimhappebakterite vastastikune mõju pärmseente ja muude jahus sisalduvate bakteritega (Siepmann *et al.* 2018: 254). Nisu- ja rukkileivajuuretiste mikroobset kooslust on palju uuritud, kuid tatraleivajuuretistes esinevate mikroobide kohta on seni veel vähe teavet.

1.3.1. Leivajuuretise tooraine mikrobiota

Üks leivajuuretise põhikomponentidest on jahu. Jahu mikrobiotas on bakterite, pärm- ja hallitusseente arvukus $2,0 \times 10^4 \dots 6,0 \times 10^6$ PMÜ/g (De Vuyst, Neysens 2005: 45). Leivajuuretise tooraineid tavaliselt ei töödelda enne tootmist, mistõttu nad rikastavad juuretist erinevate piimhappebakterite ja pärmseentega (Alfonzo *et al.* 2013: 343).

Jahus esinevad bakterid on peamiselt mesofiilid nagu näiteks gram-negatiivsed aeroobid (*Pseudomonas*) ja fakultatiivsed anaeroobid (*Enterobacteriaceae*). Samuti leidub erinevaid gram-positiivseid piimhappebaktereid. Nendeks on homofermentatiivsed pulkbakterid (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. salivarius*), heterofermentatiivsed pulkbakterid (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*), homofermentatiivsed kokid (*E. faecalis*, *Lb. lactis*, *P. pentosaceus*) ja heterofermentatiivsed kokid (*Leuconostoc* spp. ja *Weissella* spp.) (De Vuyst, Neysens 2005:45).

Samuti võivad jahus esineda mittesoovitud bakterid nagu *Staphylococcus aureus* ja *Bacillus cereus* jm. Jahu pärmseentest domineerivad perekonnad nagu *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* ja *Sporobolomyces*.

Hallitusseentest on jahus tuvastatud perekondi *Alternaria*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium* ja *Ulocladium* (pärinevad põllult) ning *Aspergillus* ja *Penicillium* (pärinevad viljahoidlast). (De Vuyst, Neysens 2005: 45)

1.3.2. Piimhappebakterid leivajuuretises

Leivajuuretistest on isoleeritud üle 60 piimhappebakteri liigi (De Vuyst *et al.* 2014: 18) ning neis on enamasti esindatud *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ja *Weissella* perekonnad (De Vuyst, Vancanneyt 2007: 122). Spontaanselt fermenteeritud leivajuuretistes domineerivad homofermentatiivsed piimhappebakterid, kuid pidevalt uuendatud leivajuuretistes heterofermentatiivsed piimhappebakterid (De Vuyst, Neysens 2005: 51). Tabelis 1 on välja toodud levinumad leivajuuretest isoleeritud obligaatselt heterofermentatiivsed, fakultatiivselt heterofermentatiivsed ja obligaatselt homofermentatiivsed piimhappebakterid. *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lb. brevis* ja *Lb. plantarum* on leivajuuretest kõige sagedamini isoleeritud laktobatsillid (Corsetti, Settanni 2007: 542). *Lb. fermentum* ja *Lb. plantarum* on hästi kohanenud elama toitainetevaeses keskkonnas, mis põhjendab nende tüvede domineerimist leivajuuretises (Stefanello *et al.* 2018: 515).

Obligaatselt heterofermentatiivsed piimhappebakterid on omased leivajuurelise fermentatsioonile, kuna neil on selleks kohanenud süsivesikute metabolism (nt. *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri* ja *Lb. sanfranciscensis* maltoosi lõhustamise võime), spetsiaalne aminohapete assimilatsioon (nt. arginiin deiminaas rada *Lb. fermentum* ja *Lb. reuteri*) ja stressivastused (nt. happestressi vastus, mis on seotud arginiin deiminaasrajaga ja stressivalkude tootmisega). (De Vuyst *et al.* 2014: 18).

Tabel 1. Leivajuuretises esinevad piimhappebakterid (Gobetti *et al.* 2008: 269-270; De Vuyst, Neysens 2005: 47; Siepmann *et al.* 2018: 246-252)

Obligaatselt heterofermentatiivsed	Fakultatiivselt heterofermentatiivsed	Obligaatselt homofermentatiivsed
<i>Lb. sanfranciscensis</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>
<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. paralimentarius</i>	<i>Lb. farciminis</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. mindensis</i>

Obligaatselt heterofermentatiivsed	Fakultatiivselt heterofermentatiivsed	Obligaatselt homofermentatiivsed
<i>Lb. fructivorans</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. amylovorus</i>
<i>Lb. pontis</i>	<i>Lb. spicheri</i>	<i>Lb. johnsonii</i>
<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. siliginis</i>	<i>Lb. nantensis</i>
<i>W. cibaria</i>	<i>Lb. paraplantarum</i>	<i>Lb. coryneformis</i>
<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. crispatus</i>
<i>Lb. frumenti</i>	<i>Lb. graminis</i>	<i>Lb. gallinarum</i>
<i>Lb. panis</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lc. garviae</i>
<i>W. confusa</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lc. lactis</i>
<i>Lb. rossiae</i>		<i>Lb. vaginalis</i>
<i>Lb. acetotolerans</i>		<i>P. pentosaceus</i>
<i>Lb. diolivorans</i>		<i>P. acidilactici</i>
<i>Lb. farraginis</i>		<i>Lb. amylolyticus</i>
<i>Lb. hammesii</i>		
<i>Lb. koreensis</i>		

Vogelmann *et al.* (2009) identifitseerisid spontaanselt fermenteeritud tatraleivajuuretisest piimhappebakterite liike *Lb. fermentum*, *Lb. paralimentarius*, *Lb. helveticus*, *Lb. pontis* ja *Lb. plantarum*. Tatraleivajuuretise mikroobset kooslust on uurinud ka Moroni *et al.* (2011), kes tuvastas spontaanselt kääritatud tatraleivajuuretises järgnevaid piimhappebaktereid: *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus graminis* ja *Pediococcus pentosaceus*, *Lb. plantarum*, *W. cibaria*, *Lc. holzapfelii*, *Lb. fermentum*, *Lb. sakei*, *Lb. graminis*, *P. pentosaceus* ja *Lb. amylovorus*.

Piimhappebakterite omadust kiirelt piimhapet toota on leivajuuretises kasutatavate kommertsiaalsete starterkultuuride valimisel oluline kriteerium (Simsek *et al.* 2006: 268). Heterofermentatiivsed piimhappebakterid kasutavad substraatidena piimhapet ja glükoosi, et toota äädikhapet, mis on efektiivne enterobakterite ja soovimatute pärmseente arengu pärssimiseks. (Stefanello *et al.* 2018: 515)

1.3.3. Pärmseened leivajuuretises

Pärmseened on üherakulised organismid, kes paljunevad vegetatiivselt pungumise või pooldumise teel. Leivajuuretises peavad pärmseened taluma madalat pH-d ja hapniku taset. Lisaks peavad pärmseened jagama leivajuuretises leiduvaid süsivesikuid (peamiselt maltoosi) piimhappebakteritega. (De Vuyst *et al.* 2016: 26)

Leivajuuretisest on identifitseeritud enam kui 20 liiki pärmseeni, nt. *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *Candida humilis*, *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida glabrata*, *Candida stellata*, *Saccharomyces pastorianus*, *Pichia fermentans*, *Pichia membranifaciens*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Saturnispora saitoi*, *Kazachstania unispora* ja *Kazachstania barnettii* on enim leivajuuretis esinevad pärmseente liigid (Daniel *et al.* 2011: 65; Stefanello *et al.* 2018: 515). Eeltoodud pärmseentest on tatrалеivajuuretis tuvastatud *K. barnetti* (Moroni *et al.* 2011: 501).

Lisaks etanoolile ja süsinikdioksiidile võivad pärmseened toota metaboliite, milleks on orgaanilised happed, diatsetüül, hargnenud ahelaga aminohapped, kõrgemad alkoholid ja neist saadud estrid, mis mõjutavad leiva maitset. Lisaks on mitmetel pärmseente tüvedel funktsionaalsed omadused, mis omavad potentsiaalseid toitumis- ja ohutusalaseid eeliseid. Need omadused hõlmavad vitamiinide tootmist, fenoolsete ühendite biosaadavuse parandamist, fütühappe defosforüülimist, probiootilise potentsiaali olemasolu ning seente ja nende mükotoksiinide produktsiooni pärssimist. (De Vuyst *et al.* 2016: 26) Tüüpilised leivajuuretiste piimhappebakteritega seotud pärmid on *Saccharomyces exiguus*, *Candida humilis* (varasem nimetus *Candida milleri*) ja *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) (Corsetti, Settanni 2007: 542).

1.3.4. Tatrалеivajuuretise mikrobioota

Üks võimalus tatrаjahu maitse, seeduvuse ja küpsetamise parandamiseks võib põhineda leiva küpsetamisel tatrалеivajuuretisega. Tatrалеivajuuretise fermentatsioon teatud piimhappebakterite tüvedega, mis produtseerivad γ -aminovõihapet, võivad suurendada toote funktsionaalseid omadusi. Lisaks aitab juuretise fermentatsioon vähendada tatrаjahus sisalduvaid antitoitaineid nt. fütaaside ja tanniinide (Moroni *et al.* 2012: 660).

1.3.5. Leivajuuretise mikroobide metabolism

Leivajuuretis on rikas kääritatavate süsivesikute poolest. Selle algne pH on 5,0-6,2. (De Vuyst, Neysens 2005: 45) Glükoosist toodavad homofermentatiivsed piimhappebakterid

homolaktililiselt kääritades peamiselt piimhapet. Heterofermentatiivsed piimhappebakterid toodavad lisaks piimhappele ka süsihappegaasi, äädikhapet ja/või etanooli. (Corsetti, Settanni 2007: 541) Fermentatsioonitemperatuur ja -aeg mõjutavad oluliselt leivajuuretise maitset. Homolaktilise fermentatsiooni läbiviimine kõrgel temperatuuril, lühikese aja jooksul (nt 37 °C, 36 h) või madalal temperatuuril, pikema aja jooksul (nt 25 °C, 48 h) võib anda tulemuseks erineva lõhna- ja maitseühendite profiiliga juuretised. (De Vuyst *et al.* 2009)

Leivajuuretise mikrobiota peamised metaboolsed aktiivsused on hapestamine (piimhappebakterid), maitse moodustumine (piimhappebakterid ja pärmseened) ning kergitamine (pärmseened ja heterofermentatiivsete piimhappebakterite liigid). (De Vuyst *et al.* 2016: 26) Stabiilne piimhappebakterite ja pärmseente vaheline metabolism on paljudes toitudes tavaline, võimaldades üksikute mikroorganismide poolt muul viisil mittekääritatavaid substraate (näiteks tärklisi) kasutada, suurendades seeläbi mikroobide kohanemisvõimet keerukates ökosüsteemides (Corsetti, Settanni 2007: 544).

Leivajuuretises leiduvad piimhappebakterid osalevad sünergistliku ja antagonistliku mõju tõttu süsivesinike ja lämmastikühendite ainevahetuses, mis stimuleerivad või pärssivad teiste mikroobide kasvu (Siepmann *et al.* 2018: 254). Fermentatsiooniprotsessi alguses on juuretises kõige rohkem süsivesikutest tärklisi, mis hüdrolyüsitakse nisu-, rukki- ja tatrajahus sisalduvate amülaasi ensüümide (α -amülaasi, β -amülaasi ja glükoamülaaside) toimel maltodekstriinideks, maltoosiks ja glükoosiks (Siepmann *et al.* 2018: 254; Takahama *et al.* 2011: 143). *Lactobacillus sanfranciscensis* maltoosi rakusisene hüdrolyüs (ei hõlma ATP tarbimist energiaallikana), vabastab glükoosi, mida omakorda tarbivad pärmseened nagu *Candida humilis*, kes ise maltoosi lagundada ei suuda. Sahharoos hüdrolyüsitakse pärmseene *Saccharomyces cerevisiae* poolt toodetud invertaasi ensüümide toimel, vabastades glükoosi ja fruktoosi, mis on piimhappebakteritele ja maltoos-negatiivsetele pärmseentele toitaineteks. Piimhappebakterite arvukuse kasvades produtseeritakse piim- ja äädikhapet, vähendades aktiivhappesust ning soodustades rukki-, nisu- ja tatrajahus sisalduvate proteaaside aktiivsust. Selle tulemuseks on alifaatsete ühendite, dikarboksüülhapete ja hüdroksüaminohapete vabanemine, millest enamikku kasutatakse pärmseente kasvuks. Lisaks vabastavad pärmseenerakud kasvu või kiirendatud autolüüsi tulemusena aminohappeid, mis on piimhappebakterite kasvu jaoks hädavajalikud. Selle piimhappebakterite ja pärmseente sünergilise kasvu tõttu on juuretisest saadud toodetel

rohkem väljendunud maitse ja pikem säilivusaeg kui ainult pärmiga kääritatud leival. (Siepmann *et al.* 2018: 254-255)

Antagonistliku vastasmõjuna on täheldatud leivajuuretises konkurentsi *S. cerevisiae* ja heterofermentatiivsete piimhappebakterite vahel. See pärmseene liik tarbib olemasolevaid suhkruid jahus suurema kiirusega kui piimhappebakterid, aeglustades sellega heterofermentatiivsete piimhappebakterite ainevahetust. (Siepmann *et al.* 2018: 255)

1.4. Külmuivatamine

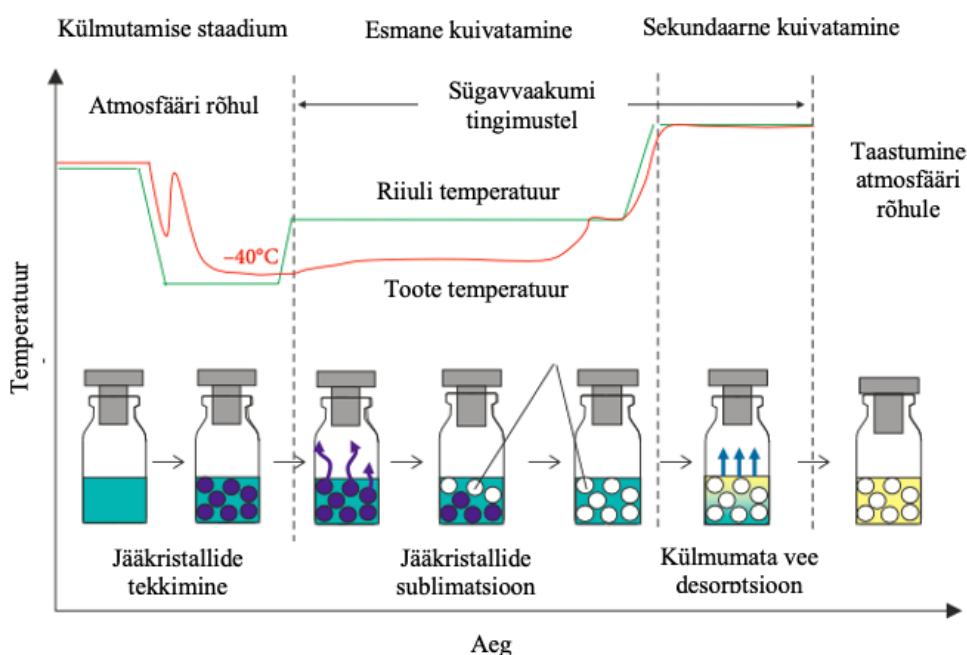
Külmuivatamine ehk lüofiliseerimine on kaheastmeline dehüdratsiooniprotsess, milles eelnevalt külmutatud materjalist eemaldatakse vesi sublimatsiooni teel (Stefanello *et al.* 2018: 511). Sublimatsiooni käigus aurustub vesi tahkest olekust, st jää muutub otse veeauruks, jättes vahele vedela faasi. Külmuivatamine on klassikaline meetod starterkultuuride pikaajaliseks säilitamiseks, kuna kuivatamine toimub madalatel temperatuuridel vähendades kuumusest põhjustatud rakukahjustusi. (Preziuso 2016/2017: 39)

Külmuivatamine on enamasti aeganõudev ning soojus- ja energiamahukas protsess. Külmutamine toimub tavaliselt mõne tunni jooksul, kuid kuivatamine kestab sageli päevi. (Kasper, Friess 2011: 248) Külmuivatamise eeliseks on toodete pikaajaline säilimine, kaitse saastumise eest säilitamise ajal ja mikroobide parem elulemus võrreldes teiste säilitamistehnoloogiatega (Abadias *et al.* 2001: 173; Ojha, Tiwari 2016: 9). Vaatamata laiapõhjalistele teadusuuringutele on mikroobide elujõu parandamine ja säilitamine endiselt üks peamisi väljakutseid tööstuslike starterkultuuride tootmisel. Kuna protsess hõlmab külmutamisetappi, siis võivad tekkida kristallide ja osmootsete pingete tõttu rakukahjustused. Selleks, et kaitsta rakke selliste kahjustuste eest külmuivatamisprotsessi läbiviimisel, võib lisada enne külmuivatamist kuivatamiskeskonda suures koguses krüoprotektante, nt. lõssipulbrit, suhkruid jne (Lacroix *et al.* 2007: 176-177)

1.4.1. Külmuivatamise tehnoloogia

Külmuivatamine koosneb kolmest etapist, milleks on külmutamine, esmane ja sekundaarne kuivatamine (Preziuso 2016/2017: 43). Enne külmuivatamist on oluline, et toode oleks eelnevalt külmutatud. Külmutamine viiakse läbi tavaliselt temperatuuril $-10\ldots-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, kas külmuivatis vaakumi all või spetsiaalsetes külmutusseadmetes (Morgan, Vesey 2009: 163-164). Materjali külmutatakse seni, kuni suurem osa veest on muutunud jääkristallideks (Kasper, Friess 2011: 248). Toote külmutamise kiirus mõjutab mikroorganismi elujulisust. Toote aeglane külmutamine aitab vältida rakumembraanide kahjustamist, aga kiire külmutamine aitab minimeerida jääkristallide kasvust põhjustatud kahjustusi (Morgan, Vesey 2009: 164).

Esmase kuivatamise ajal eemaldatakse külmutamisel tekkinud kristalne jää sublimatsiooni teel. Selleks tekitatakse vaakumpumba abil sublimatsioonikambris sügavvaakumi tingimused (rõhk madalam jää aururõhust) ja toodet soojendatakse mõõdukalt küttesüsteemiga. (Kasper, Friess 2011: 248) Tekkinud veeaur suunatakse kondensaatorikambrisse, kusjuures kondensatsioonikambri madalal temperatuuril ($-50\ldots-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) hoitud seinad külmutavad veemolekulid jääkristallideks ja püüavad enne vaakumpumpa sisenemist vett kinni (Joonis 1) (Morgan, Vesey 2009: 164).



Joonis 1. Külmuivatamise protsess (Kawasaki *et al.* 2019: 3).

Pärast esmase kuivatamise lõppu võib toode sisaldada umbes 15-20% külmunud vett (Kasper, Friess 2011: 248). Külmuivatamise kolme faasi eesmärk on vähendada jääkniiskuse taset, kus kõik bioloogilised ja keemilised reaktsioonid lakkavad. Jääkniiskus mõjutab külmuivatatud toote stabiilsust, mistõttu võib külmuivatatud mikroorganismide korral jääkniiskuse suurenemine sõltuvalt toote koostisosadest vähendada elujõuliste rakkude pikaajalist ellujäämist (Morgan, Vesey 2009: 165). Jääkvesi desorbeeritakse sekundaarse kuivatamise etapis, tavaliselt kõrgendatud temperatuuril ja madalal rõhul, et protsessi lõpptulemina saada soovitud madala niiskusesisaldusega toode (Kasper, Friess 2011: 248).

1.4.2. Leivajuuretise külmuivatamine

Kylmuivatamist kasutatakse peamiselt tundlike, enamasti bioloogilist päritolu materjalidest vee eemaldamiseks neid kahjustamata, et neid saaks säilitada ja vee lisamisega taastada (Preziuso 2016/2017: 40). Külmuivatamistehnoloogia on leidnud kasutust ka leivajuuretise säileaja pikendamisel, kuid teaduskirjandust selle kohta on vähe. Leivajuuretise eelkülmutamisel on kasutatud erinevaid režiime, nt. -80 °C, 24 h (Stefanello *et al.* 2018: 512; Siaterlis *et al.* 2008: 296), vähemalt 1 h temperatuuril -85 °C (Zayed, Roos 2004: 1082) või temperatuuril -20 °C üleöö või 24 h (Abadias *et al.* 2001: 174; Stefanello *et al.* 2019: 115). Leivajuuretiste külmuivatamised on teostatud 60 h jooksul temperatuuril -37 °C ja sügavvaakumil 40 Pa (Stefanello *et al.* 2018: 512), 48 h jooksul temperatuuril -30 °C ja rõhul 52 Pa (Rozylo *et al.* 2014: 137) ning temperatuuril -80 °C 1 ööpäeva (Caglar *et al.* 2021: 2).

1.5. Krüoprotektandid

Krüoprotektandid on ained, mille kasutamise eesmärk on minimeerida külmutamisel tekkivate jääkristallide ja madala temperatuuri kahjulikku mõju mikroobirakkudele (Stefanello *et al.* 2018: 551). Ehkki aeg-ajalt on täheldatud külmuivatatud mikroobide head elulemust ilma krüoprotektiivse aineta, suurendab sobiva krüoprotektandi olemasolu

tavaliselt mikroobide elulemust märkimisväärselt (Hubalek 2003: 205). Krüoprotektandid lisatakse külmuivatavale materjalile enne selle eelkülmutamist, et tagada mikroobidele maksimaalne kaitse (Stefanello *et al.* 2018: 551).

Mikroorganismide võime elada üle külmuivatamine on väga erinev. Üldiselt näitavad gram-positiivsed bakterid külmuivatamisel suuremat elulemust kui gram-negatiivsed bakterid. Samamoodi on mikroobide eosed külmuivatamise suhtes vastupidavamad kui vegetatiivsed rakud ning külmuivatamisele on kõige vähem vastupidavamad keskkonnatingimuste muutuste suhtes tundlikud mikroorganismid. (Morgan, Vesey 2009: 167)

Mikroorganismide külmuivatamise efektiivsust mõjutavad mitmed tegurid, näiteks mikroobiliik, tüvi, kasvufaas ja kiirus, mikroobide inkubatsioonitemperatuur, kasvukeskkonna koostis, pH, osmolaarsus, raku veesisaldus, lipiidide sisaldus ja koostis, rakkude suurus ja tihedus külmutamisel, külmutuskeskkonna koostis, jahutamiskiirus ja säilitustemperatuur (Hubalek 2003: 205). Ühte perekonda kuuluvad mikroobide liigid võivad külmutamisel, kuivatamisel ja säilitamisel sageli üsna erinevalt käituda. Näiteks mida suurem on raku pindala, seda suurem on membraani kahjustus rakuväliste jääkristallide moodustumisel külmumise ajal (Carvalho *et al.* 2004: 836-837).

Kylmuivatamine võib bioloogilisi materjale pöördumatult kahjustada. Külmumisprotsessi ajal põhjustab jääkristallide moodustumine ja rakusisese soola kontsentratsiooni suurenemine rakkudest vee väljavoolu ja rakuväliste jääkristallide moodustumise. Osmootiline šokk on rakkude elujõulisuse kadumise peamine põhjus. Selle nähtuse ennetamiseks kasutatakse krüoprotektante, kuna nad kinnitavad mikroorganisme väga kõrge viskoossusega ja madala mobiilsusreaktsiooniga materjalis (Stefanello *et al.* 2019: 91).

Krüoprotektandid võivad vastastikku kasulikult toimida. Erinevate krüoprotektantide kombineerimisel on täheldatud, et nende kaitsev toime võib olla suurem võrreldes nende üksikult kasutamisega (Hubalek 2003: 216). Krüoprotektiivseid omadusi on tuvastatud mitmetel polümeeridel, suhkrutel, albumiinidel, aminohapetel, polüoolidel ja piima komponentidel (Abadias *et al.* 2001: 174). Leivajuuretiste või neist isoleeritud mikroobide külmuivatamisel on enim kasutatud leidnud krüoprotektantidena nt. trehaloos, lõssipulber, sahharoos, sorbitool, rafinoos ja mitmed krüoprotektantide segud (Abadias *et al.* 2001: 174; Siaterlis *et al.* 2008: 298; Stefanello *et al.* 2018: 515; Stefanello *et al.* 2019: 93)

1.5.1. Krüoprotektantide klassifitseerimine

Krüoprotektandid jaotatakse klassifitseeritakse kolmeks: 1) rakuseina ja tsütoplasma membraani läbistavad (Me_2SO , glütserool); 2) rakuseina läbistavad, kuid tsütoplasma membraani mitteläbistavad (mono- ja disahhariidid, aminohapped) ning 3) rakuseina ja tsütoplasma membraani mitteläbistavad (valgud, polüsahhariidid) (Hubalek 2003: 206).

1.5.1.1. Krüoprotektiivsed mono- ja disahhariidid

Suhkrutel on kaitsev toime rakumembraanide stabiliseerimise tõhususele külmutamise ajal, kuna suhkrud vähendavad külmumistemperatuuri ja rakusisese jää teket. Lisaks on suhkrumolekulide hüdroksüülkomponentidel võime kaitsta rakke külmumisest põhjustatud rakuvigastuste eest. (Stefanello *et al.* 2019: 91) Enim kasutust leidvad krüoprotektiivsete omadustega suhkrud on sahharoos, trehaloos, laktoos, maltoos ja glükoos, mille omadusi kirjeldatakse järgnevalt.

Sahharoos ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) on disahhariid, mis asendab vesiniksidemetega vett kahekihilistes membraanides (Hubalek 2003: 207; Morgan, Vesey 2009: 169). Sahharoos on mitteredutseeriv aine, mille saab keemiliselt reaktiivsete valkude aminorühmade juuresolekul hõlpsasti jagada redutseerivateks glükoosi ja fruktoosi monosahhariidideks, mis põhjustavad Maillardi reaktsioonist (pruunistumisreaktsioonist) tulenevaid progresseeruvaid keemilisi kahjustusi (De Giulio *et al.* 2005: 744).

Trehaloos ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) on ainus glükoosi mitteredutseeriv disahhariid, mille kristallides on kaks veemolekuli ja selle kõige olulisem ülesanne on kaitsta membraanstruktuuri kuuluvaid valke ja lipiide erinevat tüüpi stressitingimuste eest, näiteks kuumuse ja külmuivatamise eest. Seda leidub looduslikult taime- ja pärmseente rakkudes (Hubalek 2003: 207-211). Trehaloosi kasutamise peamine eelis võrreldes teiste suhkrutega, näiteks sahharoosi ja laktoosiga, on selle veesidumisvõime, mis takistab rakusiseste ja rakuväliste jääkristallide teket. (Stefanello *et al.* 2018: 511) Kaitse trehaloosiga võib olla tingitud valkude stabiliseerimisvõimest, asendades vett polaarsete molekulide ümber

(Stefanello *et al.* 2019: 91). Trehaloos on suuteline kaitsma liposoomi ning bioloogilisi membraane rakkude külmutamise ja külmuivatamise kahjulike mõjude eest, asendades veemolekule dehüdratsiooni ajal, alandades kuivade lipiidide sulamistemperatuuri ja säilitada valkude ja biomolekulide aktiivsus ja struktuur (De Giulio *et al.* 2005: 740).

Laktoos ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) on disahhariid, mida on süsivesikutest kõige kõrgemas kontsentratsioonis eri loomaliikide piimas. Lehma- ja kitsepiimas leidub laktoosi 4,5–4,8% ja inimese piimas umbes 7% (Hubalek 2003: 207; Caballero *et al.* 2016: 509). Sarnaselt teistele disahhariididele on laktoos võimeline ära hoidma jääkristallide teket külmuivatamise käigus (Ojha, Tiwari 2016: 15). On leitud, et laktoos on teatud mikroobiliikide, näiteks *Lactobacillus lactis*, *Eschericia coli*, *Lactobacillus delbrueckii* ja *Saccharomyces cerevisiae*, jaoks tõhus krüoprotektant, kuid on mõõdukalt tõhus *Streptomyces tenebrarius* kaitsmisel külmuivatamise eest (Hubalek 2003: 207). Laktoos on redutseeriv suhkur, see tähendab, et sellel on vaba või potentsiaalselt vaba karbonüülrühm (laktoosi korral aldehüüdrühm). Nagu kõik redutseerivad suhkrud, võib ka laktoos osaleda Maillardi (mitteensümaatilise pruunistumise) reaktsioonis, mille tulemuseks on (kõrval) maitseühendite ja pruunide polümeeride tootmine. (Caballero *et al.* 2016: 512)

Maltoos ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) on magus ja vees hästi lahustuv disahhariid, tärglise hüdroolüüsi produkt, mida katalüüsib ensüüm amülaas (Hubalek 2003: 207; Blanco, Blanco 2017: 83). Sarnaselt trehaloosile, suudab maltoos vähendada rakkude kahanemist osmoosist tuleneva dehüdratsiooni teel enne külmumist, vähendades seeläbi rakusisese jää teket, mis aitab mikroobirakkudel ennetada lüofiliseerimisel tekkivaid rakusiseseid vigastusi (Bircher *et al.* 2018: 722).

Glükoos ($C_6H_{12}O_6$) on kõige laialdasema kasutusega monosahhariid, mida rakud kasutavad energiaallikana. Vaba glükoosina leidub seda mees, küpsetes puuviljades ja selgroogsete kehavedelikes. Glükoos integreerib ka disahhariide, sealhulgas sahharoosi ja laktoosi. Glükoos polümeriseerub, moodustades polüsahhariidimolekule nagu tärglis, tselluloos ja glükogeen (Hubalek 2003: 207; Blanco, Blanco 2017: 75). Krüomikrobioloogias on glükoosi kasutatud kontsentratsioonides 1–18% (mediaan 4%). Varasemalt on teaduskirjanduses kirjeldatud teatud bakterikultuuride paremat ellujäämist temperatuuril $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kasutades glükoosilahuseid. Mõned külmatundlikute seente tüved nagu *Phytophthora palmivora*, *Entomophthora exitialis*, *Pythium sylvaticum* ja *Pseudophaeolus baudonii*

säilitati 10% Me₂SO ja 8% glükoosi segus, mis andis positiivseid tulemusi nende mikroobide elulemusele. (Hubalek 2003: 211)

1.5.1.2. Krüoprotektiivsed aminohapped ja valgud

Naatriumglutamaat on glutamiinhappe naatriumsool, mis on inimeste ja teiste imetajate jaoks asendamatu aminohape. See on toiduvalkudes domineeriv aminohape, mis sisaldab umbes 10% kogu aminohapete sisaldusest (Fernstrom 2007: 55). Naatriumglutamaat reageerib mikroobide karboksüülrühmadega ja stabiliseerib valke (Morgan, Vesey 2009: 170). Naatriumglutamaadi kaitsvaid omadusi külmuivatamisel põhjendab selle valgu struktuuri stabiliseerumine aminorühma ja mikroorganismi valkude karboksüülrühmade vahelised reaktsioonid ning võime säilitada suuremas koguses jääniiskust (Carvalho *et al.* 2003: 208). Abadias *et al.* (2001) leidis, et naatriumglutamaati kasutades oli lüofiliseerimisel *Candida sake* rakkude elulemuse hoidmiseks väga tõhus, kuid naatriumglutamaat kombineerituna lõssipulbriga ei olnud nii efektiivne.

Lõssipulber on rasvata piimapulber, mida on kasutatud paljude mikroorganismide sügavkülmutamiseks, kuid veelgi sagedamini külmuivatamiseks kontsentratsioonis 1-10%, mõnikord ka koos teiste krüoprotektantidega. (Hubalek 2003: 215) Lõssipulbri kasutamise positiivne mõju tuleneb selle võimest moodustada kattekiht, mis kaitseb mikroorganismide rakke külmuivatamise ajal. Lisaks võivad lõssist pärit kaltsiumiioonid soodustada kaitsvat toimet. (Stefanello *et al.* 2019: 91) Lõssipulbrit on kombineeritud glutamaadiga, et tagada parim võimalik toime, kuid elulemuse osas ei ole täheldatud olulisi erinevusi *Candida sake*, *Lactobacillus fermentum* ja *Wickerhamomyces anomalus* tüvede külmuivatamisel võrreldes ainult lõssipulbri kasutamisega (Abadias *et al.* 2001; Stefanello *et al.* 2019). Lõssipulber sobib hästi külmuivatamiseks, kuna see loob külmuivatatud tootesse poorse struktuuri, mis hõlbustab rehüdratatsiooni. Piimavalgud tagavad mikroobirakkudele kaitsekatte (Carvalho *et al.* 2003: 208).

Peptoonid on valgu hüdrolüsaadid, mis sisaldavad peptiide, aminohappeid ja anorgaanilisi sooli, kuid mitte lipiide ja suhkruid. Erinevad peptoonid on suutelised kaitsma mikroorganisme külmutamise ja sulatamise ajal, kui neid kasutatakse kontsentratsioonis 0,4–20% (mediaan 0,75%). Krüoprotektiivsetel eesmärkidel on tavaliselt kõige paremad need peptoonid, mille soolasisaldus on madal ja tuhaväärtus alla 10 massiprotsendi (näiteks

bakterioloogiline, peptoonmükoloogiline ja proteospeptoon). Peptoone kasutatakse sageli külmutatavate mikroobide lahjendusvedelikuna; need pakuvad täiendavat krüokaitset teiste krüoprotektantidega, kuid nende tegelikku kaitsvat toimet on vähe uuritud. Bakterioloogiline peptoon (10%) on suurendanud külmuivatatud *Pseudomonas* sp. ja *S. cerevisiae* elulemust märkimisväärselt. (Hubalek 2003: 214)

1.5.1.3. Muud krüoprotektiivse toimega ained

Maltodekstriin on polüsahhariid, mida toodetakse tärklistest protsessis, mida nimetatakse osaliseks hüdrolyüsiks. See on tärglise lagunemine väiksemateks ühikuteks, mida nimetatakse polümeerideks. (Marcus 2019: 199) Maltodekstriin on võimeline alandama mikroobide veesidumisvõimet (Morgan, Vesey 2009: 170). Maltodekstriin toimib osmootselt mitteaktiivse tädisena, mis põhjustab peamiselt rakkude kaugenemist üksteisest ja külmunud maatriksi tugevnemist (Oldenhof *et al.* 2005: 891). On leitud, et maltoos ja maltodekstriin või nende kombinatsioon on võimelised säilitama *Saccharomyces cerevisiae* elujõuliseid rakke (Ojha, Tiwari 2016: 16).

Mannitool ($C_6H_8(OH)_6$) on suhkrualkohol, mis saadakse suhkrust (mannoosist) redutseerimise teel. Mannitool ja sorbitool (samuti suhkrualkohol) on isomeerid (Hubalek 2003: 207; Qin 2018: 126). Toidu koostisosana kasutatuna suurendab mannitool veresuhkru taset vähem kui sahharoos, omades seega suhteliselt madalat glükeemilist indeksit (Qin 2018: 126). Mannitool asendab rakkude membraanilipiididest eemaldatud vett, tänu millega tagab kaitse külmuivatamise eest (Morgan, Vesey 2009: 169).

Sorbitool ($C_6H_{14}O_6$) on valge kristalne ühend ning polüoolidest kõige parema lahustuvusega (O'Donnell, Kearsley 2012: 332). Sorbitooli kaitsvaks omaduseks on lipiidide oksüdatsiooni ennetamine tänu sorbitooli antioksidantiivsetele omadustele ja valgustruktuuri stabiliseerumine külmuivatamise ajal. Katsetulemused on näidanud, et sorbitoolil on *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *E. faecalis* ja *E. durans* säilimise ajal tugev kaitsev toime, kuigi külmuivatamisel ei täheldatud rakkude elujõulisuses olulisi erinevusi sorbitooli juuresolekul või puudumisel. (Carvalho *et al.* 2003: 208)

Mannitooli ja sorbitooli soodne mõju mikroorganismidele, mille veeaktiivsus on madal, aitavad samuti kaasa starterkultuuride elujõulisuse paranemisele (Carvalho *et al.* 2004: 838).

Glütserool [(CH₂)₂CH(OH)₃] vähendab pinnavalkudel seonduvat vett (Hubalek 2003: 207) (Morgan, Vesey 2009: 169). Glütserool (1,2,3-propaanetriool) on koos Me₂SO-ga olnud mikrobioloogias kõige laialdasemalt kasutatav krüoprotektant. Lahjendamata või 50% glütserool võeti kasutusele patogeensete prokariotide ja viiruste tavapäraseks säilitamiseks temperatuuril vahemikus +4...-20 °C ammu enne 1950. aastaid. Hiljem rakendati glütserooli kontsentratsioonides 2–55% (mediaan 10%) erinevate viiruste, bakterite, sealhulgas riketsiate ja mükoplasmade, müksomütseetide, niit-, pärm-, vetikate ja algloomade külmutamiseks. (Hubalek 2003: 210)

1.5.2. Piimhappebakteritele sobivad krüoprotektandid

Enim on sahhariididest uuritud trehaloosi, sahharoosi ja sorbitooli kui krüoprotektiivsed ained piimhappebakterite külmuivatamise üleelamiseks. Neid on uuritud nii individuaalselt kasutades kui ka omavahel segatuna (Tabel 2). Näiteks kombinatsioon trehaloosist, sahharoosist, lõssipulbrist oli kõige tõhusam krüoprotektande segu piimhappebaktereid külmuivatades, elulemusmääraga kohe pärast külmuivatamist 83–85%. Lisaks tagas see segu ka pikema elulemuse pikaajaliselt säilitades (Carvalho *et al.* 2004: 835-847).

Stefanello *et al.* (2019) uurisid leivajuuretisest isoleeritud *Lactobacillus fermentum* tüve lüofiliseerimist ning leidsid, et sahhariidid ei ole sellele tüvele parimad krüoprotektandid võrreldes lõssipulbri ja glutamaadiga. Trehaloos (doseering 5%) suutis säilitada bakteritüve elulemuse vaid 4 kuud, sahharoos (doseering 10%) veelgi vähem ehk 2 kuud. See-eest *Lactobacillus salivarius* tüve külmuivatades leiti, et kõige parem tulemus sahhariide kasutades krüoprotektandina saadi kasutades trehaloosi, seda kas üksinda või teiste krüoprotektiivsete ainetega segades (Zayed, Roos 2004: 1081). Sahharoos (doseering 10%) annab parima kaitse *Lactobacillus plantarum* ja *Lactobacillus rhamnosus* GG tüvede külmuivatamisel võrreldes trehaloosi ja sorbitooliga (Siaterlis *et al.* 2009: 297-298). Carvalho *et al.* (2004) leidsid vastupidiselt, et sorbitoolil on lüofiliseeritud *Lb. bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* ja *Enterococcus durans* tüvede säilimisel tugev kaitsev toime. Trehaloos ei ole külmuivatatud *Lactobacillus plantarum* tüve kaitsmisel märkimisväärselt tõhusam kui teised sahhariidid. *Lactobacillus rhamnosus* tüve puhul andis trehaloos isegi oluliselt halvemat kaitset. Sahharoos, millel on trehaloosiga sarnased omadused, osutus

tõhusaks, kui seda *Lactobacillus bulgaricus* bakteripulbrile säilitamisel lisada. (Carvalho *et al.* 2004: 835-847)

Tabel 2. Piimhappebakterite lüofiliseerimisel kasutatud krüoprotektandid ja nende doseeringud

Tüve nimetus	Krüoprotektant	Doseering (%)	Allikas
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Trehaloos	8	Hou <i>et al.</i> 2016
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Maltodekstriin	4	Hou <i>et al.</i> 2016
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Naatriumglutamaat	4	Hou <i>et al.</i> 2016
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lõssipulber	10	Hou <i>et al.</i> 2016
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lõssipulber	17,28	Gul <i>et al.</i> 2020
<i>Lactobacillus brevis</i>	Laktoos	2,12	Gul <i>et al.</i> 2020
<i>Lactobacillus brevis</i>	Sahharoos	10	Gul <i>et al.</i> 2020
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Trehaloos	4	Zayed, Roos 2004
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Lõssipulber	20	Gul <i>et al.</i> 2020
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Laktoos	3,75	Gul <i>et al.</i> 2020
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Sahharoos	10	Gul <i>et al.</i> 2020
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Sahharoos	15	Miao <i>et al.</i> 2008
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Trehaloos	15	Miao <i>et al.</i> 2008
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Laktoos	15	Miao <i>et al.</i> 2008
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Maltoos	15	Miao <i>et al.</i> 2008
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Naatriumglutamaat	5	Stefanello <i>et al.</i> 2019
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Lõssipulber	10	Stefanello <i>et al.</i> 2019
<i>Leuconostoc mesentroides</i>	Maltodekstriin	5	Coulibaly <i>et al.</i> 2009

Peale sahhariidide on uuritud lõssipulbri ja glutamaadi kasutamist. Kõige parema tulemuse andis glutamaadiga (doseering 5%) rikastatud lõssipulber (doseering 10%), säilitades 87% *Lactobacillus fermentum* elujõulisusest üle aasta hoiustades. Samuti on häid tulemusi andnud lõssipulbri (doseering 10%) kasutamine. (Stefanello *et al.* 2019: 90-94)

1.5.3. Pärmseentele sobivad krüoprotektandid

Pärmseente külmuivatamiseks ei ole alati sobilikud samad krüoprotektandid, mis sobivad piimhappebakteritele (Tabel 3). Abadias *et al.* (2001) leidsid, et pärmseene *Candida sake* külmuivatamisel on trisahhariididest kõige tõhusam rafinoos, mille 5%-lise ja 10%-lise kontsentratsiooni kasutamisel säilis pärmseene elulemus vastavalt 13,2% ja 19,1% ulatuses. See-eest disahhariididest laktoosi, trehaloosi ja sahharoosi vahel ei ole täheldatud suuri erinevusi pärmseente elulemusele.

Individuaalseid krüoprotektante kasutades avaldas *Candida sake* pärmseene liigile kõige suuremat mõju lõssipulber (doseering 10%) elulemusega 22% ja naatriumglutamaat (doseering 10%) elulemusega 19,8%. Polüoolid ja glütserool ei pakkunud märkimisväärset kaitset külmuivatamise suhtes. Kõikidest tulemustest pakkusid omavahel kombineeritud krüoprotektandid parimat tuge külmuivatamise üleelamiseks. Nendeks oli 10% lõssipulber, millele lisati juurde 5% või 10% glükoosi, 10% fruktoosi, 10% sahharoosi, 5% laktoosi või 10% laktoosi (elulemus 30-40%). Need tulemused näitavad, et parima külmakaitse saavutamiseks on soovitatav krüoprotektante üksteisega kombineerida. (Abadias *et al.* 2001: 180-181)

Tabel 3. Pärmseente lüofiliseerimisel kasutatud krüoprotektandid ja nende doseeringud

Tüve nimetus	Krüoprotektant	Doseering (%)	Allikas
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Laktoos	21,24	Guowei <i>et al.</i> 2019
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Trehaloos	22	Guowei <i>et al.</i> 2019
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Naatriumglutamaat	4	Guowei <i>et al.</i> 2019
<i>Candida sake</i>	Galaktoos	10	Abadias <i>et al.</i> 2001
<i>Candida sake</i>	Rafinoos	10	Abadias <i>et al.</i> 2001
<i>Candida sake</i>	Glutamaat	10	Abadias <i>et al.</i> 2001
<i>Candida sake</i>	Laktoos	10	Abadias <i>et al.</i> 2001
<i>Candida sake</i>	Adonitool	5	Abadias <i>et al.</i> 2001
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Lõssipulber	10	Stefanello <i>et al.</i> 2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sahharoos	11	N'Guessan <i>et al.</i> 2016
<i>Candida tropicalis</i>	Sahharoos	11	N'Guessan <i>et al.</i> 2016

Stefanello *et al.* (2019) leidsid, et *W. anomalus* pärmseene tüve külmuivatamiseks ja pikaajaliseks säilitamiseks on parim krüoprotektant lõssipulber (kontsentratsioonis 10%). Leiti, et glutamaadiga rikastatud lõssipulber ei avaldanud märkimisväärset mõju külmuivatamise ja säilitamise üleelamisele võrreldes ainult lõssipulbrit kasutamisega. Samuti tagas hea tulemuse trehaloos (5%). Sahharoos oli ainus krüoprotektant, mis tagas elulemuse vaid 30 päeva säilitades ja siis langes. N'Guessan *et al.* (2016) leidsid, et *Saccharomyces cerevisiae* ja *Candida tropicalis* lüofiliseerimisel tagas sahharoos (kontsentratsioonis 11%) parima tüvede elulemuse külmuivatamise järgselt ning 45 päeva säilitades Sahharoosile järgnes glükoos (kontsentratsioonis 8,1%) ja kõige madalam elulemus lüofiliseerimisjärgselt ning pikemaajalisel säilitamisel saadi kasutades glütserooli kontsentratsioonis 7,2%.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärk ja ülesanded

Bakalaureusetöö eesmärk oli nii teaduskirjanduse kui ka eksperimentaalse töö alusel anda ülevaade tatrleivajuuretest esinevatest mikroobidest ning tuvastada lüofiliseerimise ja krüoprotektantide mõju mikroobide elulemusele lüofiliseeritud tatrleivajuuretestes.

Bakalaureusetöö ülesanded:

- 1) tutvuda teaduskirjandusega ning anda ülevaade tatrleivajuuretest mikroobidest ning lüofiliseerimise ja erinevate krüoprotektantide mõjust piimhappebakterite ja pärmseente elulemusele;
- 2) planeerida ja teostada tatrleivajuuretest fermenteerimise ja lüofiliseerimise katsed;
- 3) hinnata lüofiliseerimise ja krüoprotektantide mõju mikroobide elulemusele lüofiliseeritud tatrleivajuuretestes;
- 4) hinnata krüoprotektantide ja kommersiaalsete starterkultuuride mõju lüofiliseeritud tatrleivajuuretestega valmistatud tatrleibade sensorsetele omadustele.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Uuritav materjal

Bakalaureusetöö algmaterjaliks oli Eesti väiketootjalt pärinev käsitöönduslik tatrleivajuuretis (emajuuretis), mida uuendati seitsme ööpäeva tagant toortatrajahu, suhkru ja joogiveega. Alajuuretest valmistati omakorda kaks uut tatrleivajuuretest, mis sisaldasid kommersiaalseid starterkultuure. Analüüsiti nii lüofiliseerimata kui lüofiliseeritud tatrleivajuuretesti. Töö raames viidi läbi kuus katset ajaperioodil 11.01.-3.05.2021.

2.2.2. Tatraleivajuuretiste fermenteerimine

Tatrleivajuuretise fermentatsiooni käivitamiseks lisati 245 g aljuuretisele 840 ml joogivett, 70 g toortatrajahu (Tõrvaaugu Mahe talu mahe toortatrajahu, Eesti) ja 70 g suhkrut (Dan Sukker, Leedu). Pärast seda jaotati juuretis kolmeks võrdseks osaks. Ühele osale juuretisele lisati kommertsiaalset starterkultuuri Lyoflora B12 (*Sacco Srl., Itaalia*) ja teisele osale juuretisele lisati starterkultuuri Lyoflora BLN1 (*Sacco Srl., Itaalia*). Kolmandale osale juuretisele (kontrollproov) ühtegi starterkultuuri ei lisatud. Starterkultuurid Lyoflora B12 ja Lyoflora BLN1 sisaldasid heterofermentatiivseid piimhappebaktereid, vastavalt *Lactobacillus fermentum* ja *Leuconostoc mesenteroides*, eesmärgiga parandada leivajuuretise võimet toota rohkem süsihappegaasi ning seeläbi asendada pagaripärmi kasutamist leivataina kergitamisel.

Kõiki kolme tatrleivajuuretit fermenteeriti inkubaatoris (*Memmert BE 500, Saksamaa*) 24 h temperatuuril 25 °C. Pärast esmast fermentatsiooni segati igale juuretisele (408 g) juurde 195 g mahe toortatrajahu, 22 g suhkrut ja 3 g keedusoola ning jätkati juuretiste fermenteerimist inkubaatoris veel 4 h temperatuuril 25 °C.

Fermentatsioonijärgselt tähistati tatrleivajuuretised järgnevalt: fermenteeritud tatrleivajuuretis (FTJ), fermenteeritud tatrleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora B12 (FTJ+B12) ja fermenteeritud tatrleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora BLN1 (FTJ-BLN1). Fermentatsiooni lõpul eraldati kontrollproovist (FTJ) 245 g juuretit, mida järgnevates katsetes kasutati algmaterjali ehk emajuuretisena.

2.2.3. Tatrleivajuuretiste lüofiliseerimine

Fermenteeritud tatrleivajuuretiste lüofiliseerimisel kasutati krüoprotektantidena trehaloosi (*TREHATMTM, Hayashibara Co., Ltd*), sahharoosi (*Sigma Aldrich*), maltoosi (*Maltose Monohydrate, Duchefa Biochemie*) ja maltodekstriini (*Tate & Lyle*). Tatrleivajuuretistele lisati kahe krüoprotektandi kombinatsioon, millest ühel on toime piimhappebakteritele (trehaloos, maltodekstriin) ja teisel pärmseentele (maltoos, sahharoos). Juuretistele lisatud krüoprotektantide doseeringud olid järgnevad: trehaloos 6% ja sahharoos 8% ning maltoos

10% ja maltodekstriin 5%. Krüoprotektantide ja nende doseeringute valimisel lähtuti Coulibaly *et al.* (2009), N'Guessan *et al.* (2016) ja Stefanello *et al.* (2018) uurimistööde tulemustest, kus leiti, et antud krüoprotektantide koguste kasutamisel saavutati piimhappebakterite ja pärmseente kõrgem elulemus külmuivatamise järgselt. Trehaloosi ja sahharoosi kombinatsiooni kasutati I, III, V katses ning maltoosi ja maltodekstriini kombinatsiooni II, IV, VI katses.

Enne lüofiliseerimist asetati fermenteeritud tatraleivajuuretised õhukese kihina fooliumiga kaetud restidele ning eelkülmutati 2 h temperatuuril -20 °C. Tatraleivajuuretest lüofiliseerimisel kasutati Eesti Maaülikooli mikromeiereis olevat lüofilisaatorit (*Armfield FT33 – Vacuum Freeze Dryer, Inglismaa*), mis koosneb jahutussüsteemist, küttekehast, vaakumpumbast, töö- ja kondensatsioonikambrist.

Fermenteeritud tatraleivajuuretest lüofiliseerimisel juhinduti järgnevast katseprotokollist:

1. Kondensatsioonikambris langetati temperatuur -30 °C-ni.
2. Töökambrisse asetati eelkülmutatud fermenteeritud tatraleivajuuretised.
3. Lülitati tööle vaakumpump (vaakumi sügavus ~0,2 mbar).
4. Leivajuuretesti hoiti 60 h lüofilisaatoris, töökambri temperatuur oli -30 °C ja kondensatsioonikambri temperatuur oli -45 °C.

Lüofiliseerimisjärgselt märgistati tatraleivajuuretised järgnevalt:

- lüofiliseeritud tatraleivajuuretis (LTJ), trehaloosi ja sahharoosi sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis (LTJ+TS) ning maltoosi ja maltodekstriini sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis (LTJ+MM);
- lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora B12 (LTJ-B12), trehaloosi ja sahharoosi sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora B12 (LTJ-B12+TS) ning maltoosi ja maltodekstriini sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora B12 (LTJ-B12+MM);
- lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora BLN1 (LTJ-BLN1), trehaloosi ja sahharoosi sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora BLN1 (LTJ-BLN1+TS) ning maltoosi ja maltodekstriini sisaldav lüofiliseeritud tatraleivajuuretis starterkultuuriga Lyoflora BLN1 (LTJ-BLN1+MM).

Lüofiliseeritud juuretiste pikemaajaliseks säilitamiseks pakendati need 50 ml plasttubidesse, mille kork kaeti parafilmiga. Proove säilitati üks kuu temperatuuril +25 °C ja +4 °C ning neist teostati mikrobioloogilised analüüsid.

2.2.4. Mikrobioloogilised analüüsid

2.2.4.1. Proovide ettevalmistus mikrobioloogilisteks analüüsideks

Mikrobioloogilised analüüsid teostati nii lüofiliseerimata fermenteeritud tatrleivajuuretest kui ka lüofiliseeritud tatrleivajuuretest ja kahel temperatuuril (+4 °C, +25 °C) säilitatud lüofiliseeritud tatrleivajuuretest. Lisaks tatrleivajuuretestele teostati mikrobioloogilised analüüsid mahe toortatrajahust eesmärgiga määrata kasutatud toorme mikrobioloogiline kvaliteet.

Analüüsitavatest tatrleivajuuretest ja mahe toortatrajahust teostati lahjendused. Selleks kaaluti 10 g tatrleivajuuretest/toortatrajahu 90 ml steriilsesse 0,1% peptoonlahusesse ning homogeniseeriti homogenisaatoris (*Stomacher®400 Circulator, Seward Ltd., Inglismaa*) 300 rpm/1 min, mille tulemusel saadi proovi kümnekordne lahjendus (10^{-1}). Edasi tehti lahjenduste rida 10^{-2} ... 10^{-8} , kus iga järgmise kümnendlahjenduse jaoks võeti 1 ml eelmist lahjendust, mis lisati 9 ml 0,1% peptoonlahusesse. Erinevate katsete korral lahjenduste rea pikkus erines vastavalt sellele, kas tegemist oli fermenteeritud tatrleivajuuretisega, lüofiliseeritud tatrleivajuuretisega või üks kuu erinevatel temperatuuridel säilinud lüofiliseeritud tatrleivajuuretestega.

2.2.4.2 Mikrobioloogilised külvid

Töös kasutatud tardsöötmed mikroobide kasvatamiseks olid järgmised:

- bakterite üldarv: Mipp. Plate Count Agar (*LAB 115, LabM Ltd, Inglismaa*); Tryptic Soy Agar (*LabM Ltd., Inglismaa*);
- hallitus- ja pärmseente üldarv: Sabouraud Dextrose Agar (*CE, LabM Ltd, Inglismaa*);

- *coli*-laadsed bakterid: Violet Red Bile Agar (*LAB 31, LabM Ltd., Inglismaa*);
- piimhappebakterid: M.R.S. Agar (*de Man, Rogosa and Sharpe Agar, LabM Ltd, Inglismaa*).

Bakterite ning hallitus- ja pärmseente üldarvu määramisel kasutati süviskülvi tehnikat. Selleks pipeteeriti 1 ml uuritava materjali vastavat lahjendust paralleelselt kahele Petri tassile, millele valati peale steriilne ligi 50 °C mikroobide kasvumeedium ehk sööde. Sööde ja lahjendus segati ning jäeti tarduma.

Bakterite, hallitus- ja pärmseente, *coli*-laadsete bakterite ja piimhappebakterite vastavatele tahketele kasvumeediumitele tehti 10 µl külviaasaga leivajuuretiste lahjendustest tihe ühtlane pindkülv ning lasti sel söötmesse imenduda.

Külvitassid asetati inkubaatoritesse (*Memmert BE 500, Saksamaa*): bakterite üldarvu süviskülvitassid ja pindkülvitassid kuni 72 tunniks 30 °C juurde, *coli*-laadsete pindkülvitassid üheks ööpäevaks 37 °C juurde ning hallitus- ja pärmseente pindkülvitassid kuni 5 ööpäevaks 25 °C juurde, aeroobsed piimhappebakterite pindkülvitassid kuni 72 tunniks 35 °C juurde, anaeroobsed piimhappebakterite pindkülvitassid anaeroobsesse keskkonda kuni 72 tunniks 35 °C juurde ja mikroaeroobsed piimhappebakterite pindkülvitassid 10% CO₂ kontsentratsiooni kasvukeskkonda kuni 72 tunniks 35 °C juurde.

Pärast väljakülvide inkubeerimist loendati väljakasvanud kolooniad tassidelt, kus pesasid moodustavate ühikute arv (PMÜ) jäi alla 300. Paralleelsete külvide tulemustest arvutati keskmine PMÜ arv (PMÜ/g).

Bakalaureusetöö kuue katse raames teostati kokku 3194 mikrobioloogilist külvi.

2.2.4.3. Mikroobide pesa- ja rakumorfoloogia

Pindkülvitassidel väljakasvanud erinevate morfoloogiliste tunnustega kolooniatest valmistati Gram'i meetodil värvitud preparaadid ja märgpreparaadid ning kirjeldati nende pesa- ja rakumorfoloogiat (suurus, kuju, asetus, värvumine). Preparaate mikroskopeeriti kasutades valgusmikroskoopi (*Carl Zeiss, AxioStar plus*) ja 1000x suurendust. Mikroskoobi

abil kirjeldati mikroobirakkude morfoloogilisi tunnuseid – Gram'i järgi värvumist, suurust, kuju ja asetust jne.

2.2.4.4. Mikroobide identifitseerimine MALDI-TOF MS meetodil

Mikroskopeeritud mikroobikolooniatest teostati ühtlased pindkülvid steriilsetele agarsöötmetele, mida kasvatati 24 h temperatuuridel 25 °C, 30 °C ja 35 °C aeroobses, anaeroobses ja mikroaeroobses (10% CO₂) kasvukeskkonnas. Mikroobi isolaadid samastati MALDI-TOF MS analüüsi meetodil Tartu Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi toidumikrobioloogia osakonna poolt.

2.2.5 Füüsikalised-keemilised analüüsid

2.2.5.1. Aktiivhappesus ja tiitritav happesus

Aktiivhappesuse mõõtmiseks asetati proovi pH-meetri (*Mettler Toledo S210*) elektrood. Aktiivhappesus määrati fermenteeritud tatrleivajuuretest kohealt pärast fermentatsiooni lõppu.

Tiitritav happesus määrati tiitrimismeetodil, millega mõõdetakse analüüsitavas materjalis olevad vabad kui ka seotud vesinikioonid ning mõõtmise tulemusi väljendatakse Thörneri kraadides (°Th). Thörneri kraadid näitavad palju kulus naatriumhüdrokksiidi vesilahust 2-3 g proovi happesuse neutraliseerimiseks. Tiitritava happesuse määramiseks tatrleivajuuretest kasutati automaatse tiitrijat (*SI Analytics Titrator TitroLine® 7000*). Selleks kaaluti keeduklaasi 2-3 g proovi ja lisati juurde 30 ml destilleeritud vett. Keeduklaasi lisati magnet ning pandi see magnetsegajale (*Heidolph MR 1000, Saksamaa*). Seejärel asetati pH-meetri elektrood ja NaOH (0,1 M) lahuse voolik keeduklaasi nii, et elektroodi ots oleks kaetud prooviga. Tiitriti NaOH lahusega, kuni pH saavutas väärtuse 8,3. Igast fermenteeritud tatrleivajuuretest mõõdeti aktiivhappesust ja tiitritavat happesust kolmes korduses.

2.2.5.2. Vee aktiivsus

Vee aktiivsuse (a_w) määramiseks tatraleivajuuretisest asetati topsi proovi piisavalt, et selle põhi oleks kaetud ning asetati vee aktiivsust mõõtvasse seadmesse (*AquaLab Series 3 TE, Washington*). Vee aktiivsust mõõdeti igast proovist kolm korda.

2.2.5.3. Kuivainesisaldus

Kuivainesisalduse mõõtmiseks kasutati kuivaineanalüsaatorit (*HR83 Halogen, Mettler Toledo*). Analüüside läbiviimiseks kaaluti 4 g fermenteeritud tatraleivajuuretest alumiiniumalusele ning viidi läbi mõõtmised temperatuuril 110 °C. Kuivainesisaldust määrati igast proovist kolm korda.

2.2.6. Tatralebade valmistamine

Lüofiliseeritud tatraleivajuuretiisi kasutati tatralebade valmistamisel, et hinnata krüoprotektantide ja lisatud starterkultuuride mõju tatraleiva omadustele. Peeneks pulbriks uhmerdatud külmuivatatud tatraleivajuuretisele (60 g) lisati 600 ml vett, 50 g toortatrajahu ja 50 g suhkrut. Tatraleivajuuretiisi fermenteeriti inkubaatoris (*Memmert BE 500, Saksamaa*) 24 h temperatuuril 25 °C. Pärast esmast fermentatsiooni segati juuretisele lisaks 450 g toortatrajahu, 50 g suhkrut ja 8 g soola ning asetati eelnevalt toiduõliga määratud leivavormi. Seejärel fermenteeriti inkubaatoris veel 4 h temperatuuril 25 °C. Pärast seda küpsetati tatraleiba ahjus (*Sveba Dahlen D11F, Rootsi*) 200 °C juures 20 minutit, 170 °C juures 10 minutit ning 5 minutit vormist välja võetult.

2.2.7. Tatralebade sensoorne analüüs

Sensoorsel hindamisel osales assessorina 9 Eesti Maaülikooli Toiduteaduse ning toiduainete tehnoloogia õppetooli töötajat ja üliõpilast. Igale assessorile esitati kuuest tatralebast 5 g sensoorseks hindamiseks. Tatraleiva sensoorsel hindamisel paluti assessoritel anda hinnang

tatraleiva tekstuurile, välimusele, lõhnale ja maitseomadustele 10-punkti joonskaalal (Lisa 1). Proovide hindamine toimus pimekatse tingimustes ehk assessoritele ei antud proovide kohta taustainformatsiooni.

Hindamisel kasutati joonskaalat pikkusega 10 cm. Hinnatavad parameetrid valiti "Sensoorse analüüsi käsiraamatu" (2018) põhjal. Välimuse kohta paluti hinnata nelja parameetrit: kooriku ja sisu värvust, pinna tekstuuri, pooride suurust. Lõhna puhul hinnata üldist intensiivsust, lõhna hapukust, magusust ja teraviljasust. Maitse juures paluti kirjeldada üldist intensiivsust, hapukat, magusat või soolakat maitset. Tekstuuri puhul paluti hinnata pehmust, niiskust, kleepuvust ja pudenevust. Kõikide parameetrite tulemuste kohta arvutati keskmised.

2.2.8. Andmete statistiline analüüs

Eksperimentaalsete katsete jooksul kogutud andmete statistiliseks analüüsiks kasutati programmi Microsoft Office Excel. Säilekatsete tulemused väärtusega >300 PMÜ asendati andmeanalüüsiks vastava proovi algväärtuse ja väärtuse 300 keskmisega. Krüoprotektanti mitte sisaldavad kontrollproovid tähistati andmete statistiliseks analüüsiks vastavalt katses kasutatud krüoprotektandile kas LTJ_{TS}, LTJ-B12_{TS}, LTJ-BLN1_{TS} või LTJ_{MM}, LTJ-B12_{MM}, LTJ-BLN1_{MM}. Krüoprotektanti sisaldavate proovide ja vastavate kontrollproovide keskmiste bakterite arvukuste võrdlemiseks kasutati T-testi. Keskmiste erinevus loeti statistiliselt oluliseks, kui $p < 0,05$.

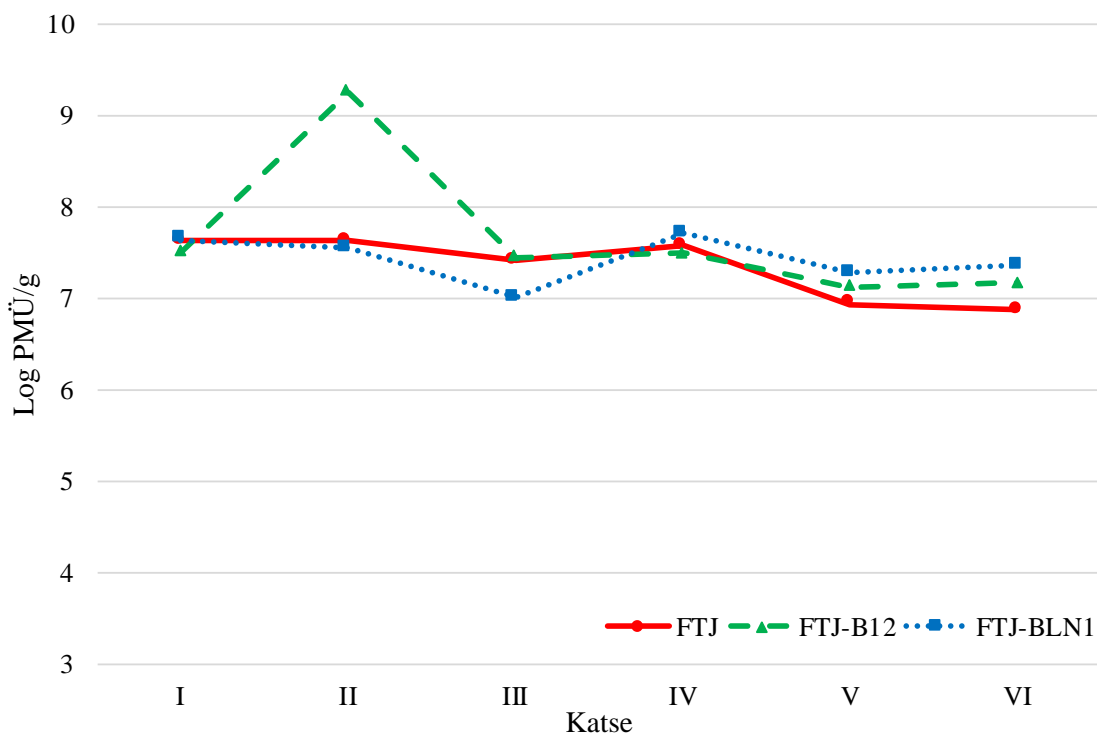
3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Mikrobioloogiliste külvide tulemused

3.1.1. Bakterite üldarv tatraleivajuuretistes

Kuue katse jooksul varieerus FTJ proovis bakterite üldarv vahemikus 6,9-7,6 log PMÜ/g, FTJ-B12 bakterite üldarv jäi vahemikku 7,1-9,3 log PMÜ/g ja FTJ-BLN1 bakterite üldarv oli 7,0-7,9 log PMÜ/g. Tulemused on kooskõlas Yağmur *et al.* (2016), kelle uuringu andmetel võib bakterite üldarv leivajuuretises varieeruda vahemikus 5,51-8,10 log PMÜ/ml. Jooniselt 2, mis iseloomustab fermenteeritud tatraleivajuuretiste bakterite üldarvu kasvudünaamikat katsete jooksul, nähtub et FTJ ja FTJ-BLN1 bakterite üldarv on olnud katsete jooksul stabiilsemad kui FTJ-B12. Bakterite üldarvu kõrgem sisaldus esines juuretises FTJ-B12, mida võib seostada starterkultuuri *Lactobacillus fermentum*’i lisamise ja selle parema kohanemisvõimega kasvukeskkonnas.

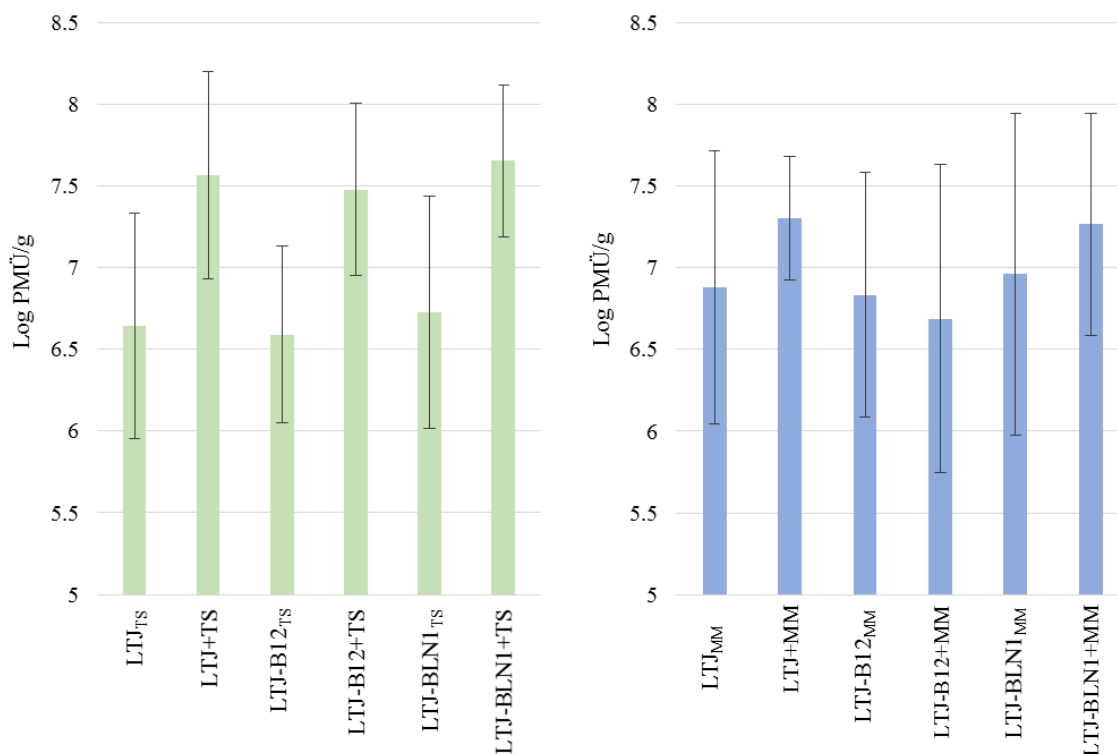
Leivajuuretise mikroobide arvukust ja mikroobset kooslust mõjutavad tooraine (jahu, vesi jm), juuretise värksendamise (toitmine jahu-vee seguga) sagedus, fermentatsiooniaeg ja –temperatuur, ümbritsev tootmiskeskkond jne (De Vuyst *et al.* 2009: 666, Vogelmann, Hertel 2011: 583, Lhomme *et al.* 2016: 48). Leivajuuretis mikroobne kooslus on metaboolselt aktiivsem kui mikroobide üldarv on ligikaudu 8,3 log PMÜ/g (Stefanello *et al.* 2018: 513). Mida kõrgem on leivajuuretiste mikroobide arvukus, seda aktiivsem on juuretis ja seda kiiremini suudab leivajuuretis leivatainast hapestada. (Siepmann *et al.* 2018: 247)



Joonis 2. Bakterite üldarvu kasvudünaamika fermenteeritud tatraleivajuuretistes.

Bakterite üldarvu kadu lüofiliseerimisjärgselt võrreldes fermenteeritud tatraleivajuuretiste proovidega oli kontrollproovides suurem kui proovides, millesse oli lisatud krüoprotektante. Kontrollproovides LTJ_{TS} ja LTJ_{MM} oli kadu vastavalt 10% ja 6%, kontrollproovide LTJ-B12_{TS} ja LTJ-B12_{MM} puhul oli see vastavalt 14% ja 11%, kontrollproovide LTJ-BLN1_{TS} ja LTJ-BLN1_{MM} kadu oli aga vastavalt 9% ja 6%.

Joonisel 3 on esitatud lüofiliseeritud tatraleivajuuretiste bakterite keskmised üldarvud, mis olid kontrollproovides madalamad kui proovides, millele oli lisatud krüoptotektante, ehkki erinevused ei olnud statistiliselt olulised ($p > 0,05$). Proovide LTJ+TS, LTJ-B12+TS ja LTJ-BLN1+TS keskmised bakterite üldarvud olid kontrollproovide keskmistest bakterite üldarvudest 0,9 log PMÜ/g võrra kõrgemad. LTJ+MM, LTJ-BLN1+MM puhul olid samuti keskmised bakterite üldarvud kõrgemad võrreldes kontrollproovide keskmistega (vastavalt 0,4 log PMÜ/g ja 0,3 log PMÜ/g). LTJ-B12+MM vastav näitaja oli aga kontrollproovi keskmisest 0,1 log PMÜ/g võrra madalam. Seega oli bakterite üldarvule juuretistes suurem kaitse trehaloosil ja sahharoosil.



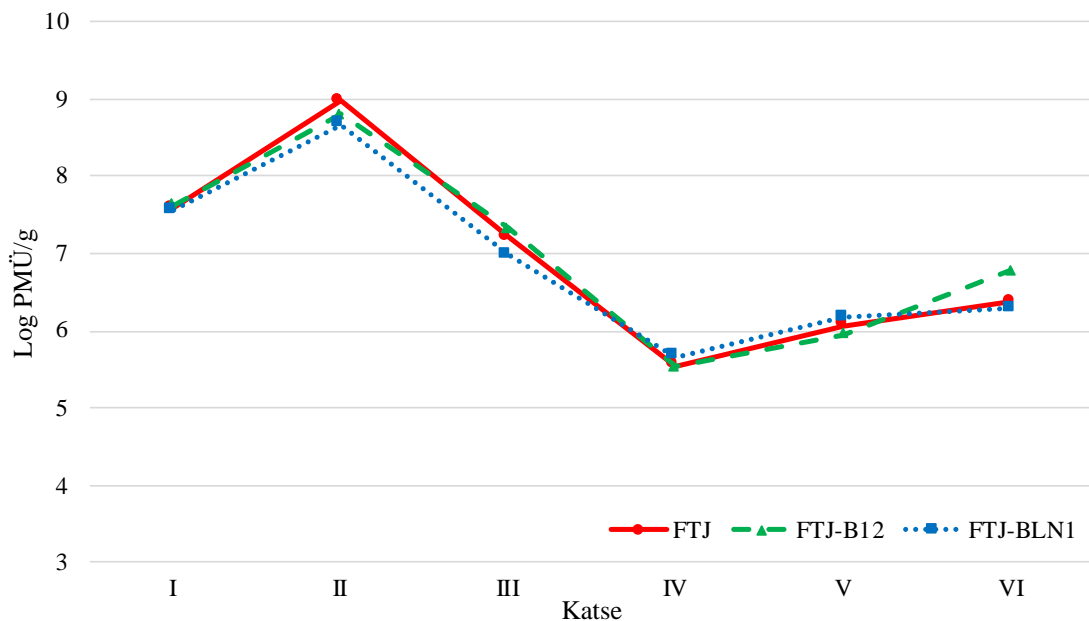
Joonis 3. Bakterite üldarvude keskmised ja standardhälbed lüofiliseeritud tatraleivajuuretestes.

Lisaks valkude struktuuri ja funktsiooni kaitsmisele kuivatamise ajal suudavad trehaloos ja muud süsivesikud (nt sahharoos) alandada kuivmembraanide üleminekutemperatuuri, asendades lipiidide peagruppide vahel vett. See nähtus hoiab ära faaside ülemineku ja sellega kaasnevad lekked rehüdreerimisel. (Carvalho *et al.* 2004: 842)

3.1.2. Hallitus- ja pärmseente üldarv tatraleivajuuretestes

Pärmseente üldarvud varieerusid katsete käigus FTJ proovis 6,0-8,9 log PMÜ/g, FTJ-B12 pärmseente arvukus oli vahemikus 5,5-8,8 log PMÜ/g ja FTJ-BLN1 puhul olid tulemused vahemikus 5,7-6,7 log PMÜ/g. Fermenteeritud tatraleivajuuretestes pärmseente kasvudünaamika katsete vältel on välja toodud Joonisel 4, millelt nähtub, et tatraleivajuuretestes kõrgeim pärmseente arvukus oli II katsel. Pärast seda pärmseente aktiivsus juuretestes langes. Vaatamata sellele, on antud katse pärmseente arvukused siiski kooskõlas kirjandusallikatega. Wang *et al.* (2020) andmetel peaks leivajuuretestes esinema pärmseeni 6-7 log PMÜ/g piisava etanooli ja süsihappegaasi produktsiooniks. Stefanello *et*

al. (2018) uuringus oli spontaanselt käivitatud leivajuuretises 14. fermentatsioonipäeval pärmseente arv 7,44 log PMÜ/ml. Toortatrajahus leidis hallitus- ja pärmseeni 5,2 log PMÜ/g.

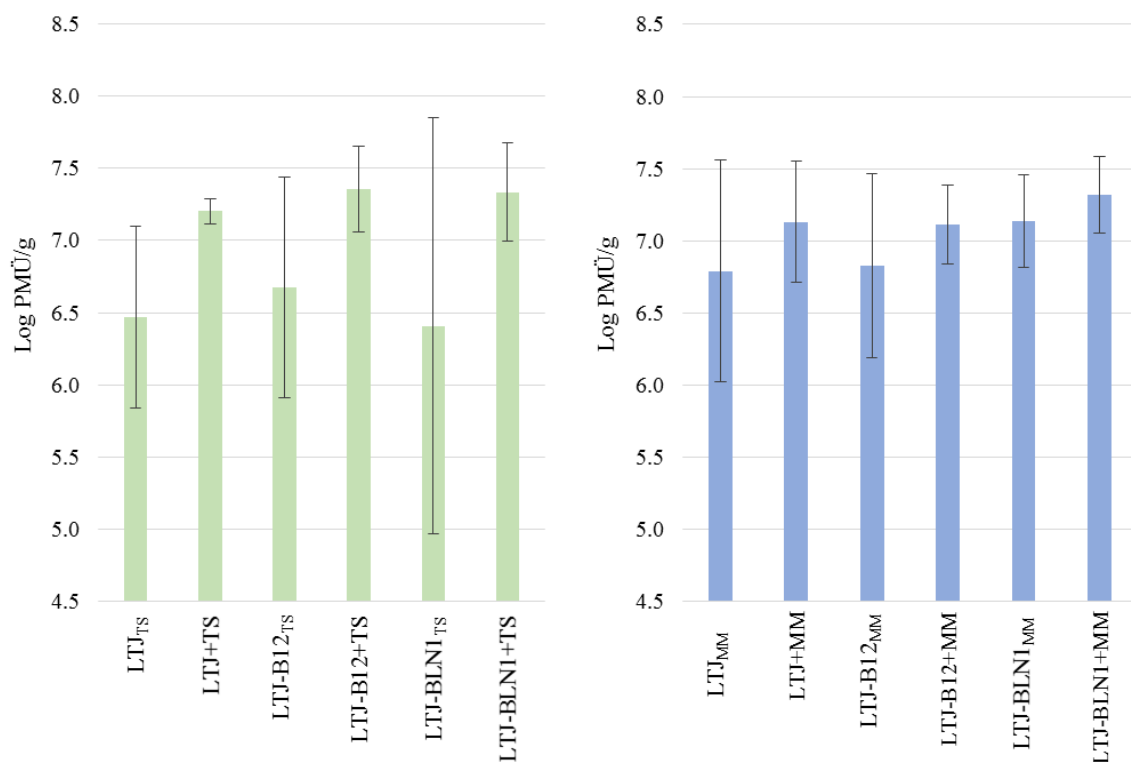


Joonis 4. Pärmseente kasvudünaamika fermenteeritud tatrалеivajuuretistes.

Kontrollproovides esines lüofiliseerimisjärgne pärmseente arvukuse kadu, kus LTJ_{TS} ja LTJ_{MM} kadu oli vastavalt 7% ja 2%, LTJ-B12_{TS} ja LTJ-B12_{MM} kadu oli vastavalt 5% ja 3%, LTJ-BLN1_{TS} kadu oli 7%. Proovis LTJ-BLN1_{MM} oli aga pärast lüofiliseerimist pärmseente arvukus 4% kõrgem võrreldes fermenteeritud tatrалеivajuuretisega. Caglar *et al.* (2021) uuringus lüofiliseeriti leivajuuretisi, mille pärmseente arvukus värskes juuretis oli 9,7 log PMÜ/g ja pärast lüofiliseerimist oli 8,0 log PMÜ/g, mis tähendab, et pärmseente arvukus langes 1,7 log PMÜ/g võrra. Ka antud töös langes pärmseente arvukus kontrollproovides, kuid mitte nii suurel määral.

Joonisel 5 on välja toodud lüofiliseeritud tatrалеivajuuretide keskmised pärmseente arvukused kontrollproovides ning krüoprotektantidega proovides. Kontrollproovides oli keskmine pärmseente arvukus madalam kui krüoprotektante sisaldavates proovides, kuid erinevused polnud statistiliselt olulised ($p > 0,05$). LTJ+TS ja LTJ-B12+TS puhul oli pärmseente arvukuse keskmise erinevus kontrollproovi keskmisest 0,7 log PMÜ/g, LTJ-BLN1+TS korral oli pärmseente arvukuse keskmise erinevus 0,9 log PMÜ/g. LTJ+MM ja LTJ-B12+MM puhul oli pärmseente arvukuse keskmise erinevus 0,3 log PMÜ/g, LTJ-

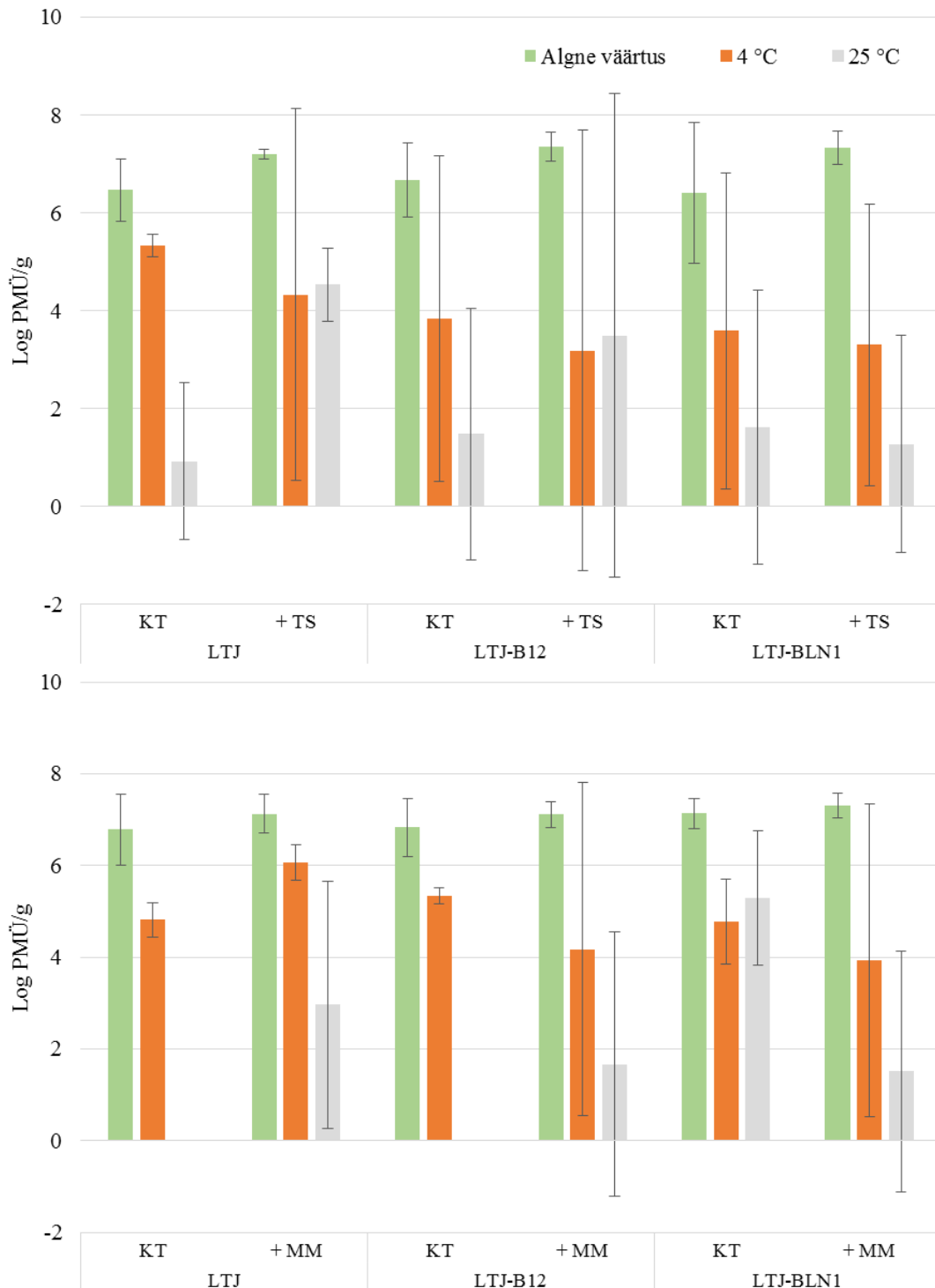
BLN1+MM puhul 0,2 log PMÜ/g. Keskmiste arvukuste erinevuse põhjal tagab suurema kaitse pärmseente elulemusele lüofiliseeritud tatrleivajuuretistes trehaloos ja sahharoos. N'Guessan *et al.* (2016) uuringus leiti, et pärmseente *Saccharomyces cerevisiae* ja *Candida tropicalis* lüofiliseerimisel tagas parima kaitse sahharoos (doseering 11%). Guowei *et al.* (2019) leidsid, et *Saccharomyces boulardii* kaitse lüofiliseerimisel tagas trehaloos (doseering 22%), kus pärmseene elulemus oli 9,97 log PMÜ/g. Guowei *et al.* tulemus on kõrgem kui antud töö katsetuste tulemus, kuna teadusuuringus lüofiliseeriti puhaskultuuri, mille algne rakkude kontsentratsioon oli kõrgem. Tatrleivajuuretise mikrobiotas võib see-eest leiduda erinevaid pärmseente liike, mistõttu krüoprotektiivsete ainete toime võib varieeruda. Sellest tulenevalt on oluline teada, millised pärmseente liigid leivajuuretise koosluses leiduvad ning millised on nende biokeemilised ja funktsionaalsed omadused (mõju leiva omadustele) ning lähtuvalt sellest valida sobilikud krüoprotektiivsed ained.



Joonis 5. Pärmseente üldarvude keskmised ja standardhälbed lüofiliseeritud tatrleivajuuretistes.

Lüofiliseeritud tatrleivajuuretiste säilekatse tulemused on välja toodud joonisel 6, kus nähtub, et kõigis proovides toimus pärmseente arvukuse langus võrreldes algse väärtusega ehk pärast lüofiliseerimist analüüsitud proovidega. Selgus, et hoiustades temperatuuril 4 °C

oli pärmseente arvukus enamasti kõrgem kui 25 °C juures säilitamisel (va LTJ-B12+TS ja LTJ-BLN1_{MM}). Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et madalamad temperatuurid on mikroobidele sobilikumad.



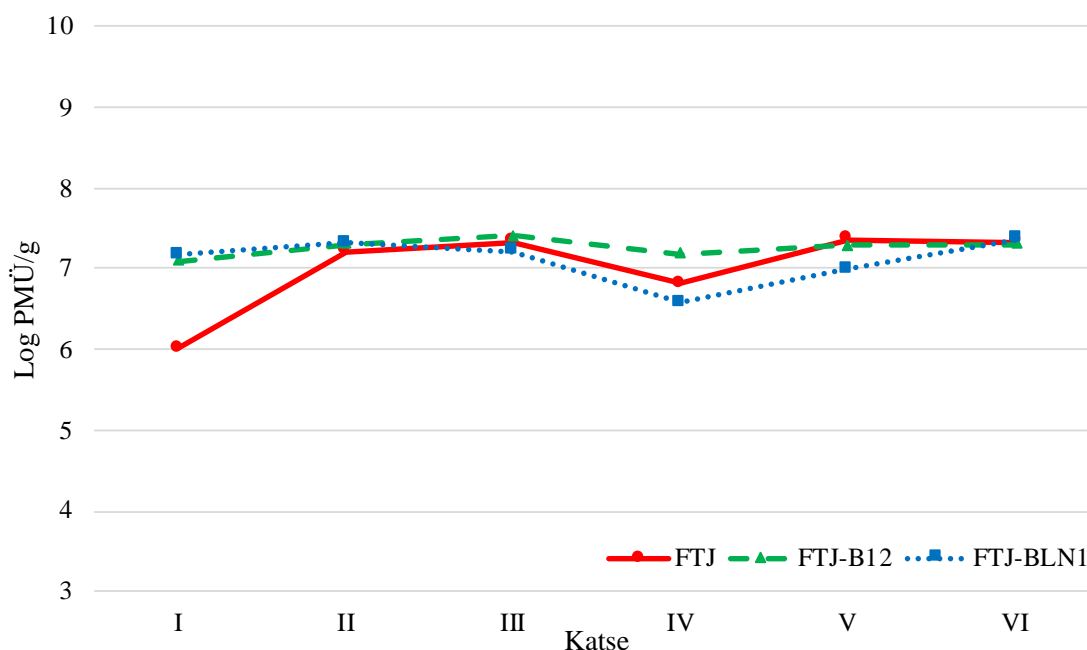
Joonis 6. Pärmseente üldarvude keskmised ja standardhälbed lüofiliseeritud tatraleivajuuretestide kontrollproovides (KT) ja krüoprotektanti sisaldavates proovides (+MM või +TS) algselt ja 1 kuu säileaja lõpul.

Temperatuuril 4 °C säilitades oli kõrgem pärmseente keskmine arvukus maltoosi ja maltodekstriiniga lüofiliseeritud proovides, temperatuuril 25 °C säilitades aga trehaloosi ja sahharoosiga külmuivatatud proovides. Ühe säilekuu lõpuks kaotasid pärmseened elulemuse täielikult 25 °C juures hoiustatud LTJ_{MM} ja LTJ-B12_{MM}.

3.1.3. Piimhappebakterid tatrалеivajuuretistes

3.1.3.1. Aeroobsete piimhappebakterite üldarv tatrалеivajuuretistes

Joonisel 7 on välja toodud aeroobsete piimhappebakterite kasvudünaamika fermenteeritud tatrалеivajuuretistes. Aeroobsete piimhappebakterite arv värskes FTJ proovis oli vahemikus 6,0-7,4 log PMÜ/g, FTJ-B12 vahemikus 7,1-7,4 log PMÜ/g ja FTJ-BLN1 tulemus oli 6,6-7,4 log PMÜ/g. Aeroobsete piimhappebakterite arvukus oli FTJ proovis esimesel katsetusel madalam kui lisatud starterkultuuridega tatrалеivajuuretistes. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et mida rohkem tatrалеivajuuretest värskendati, seda stabiilsemaks muutus selle aeroobsete piimhappebakterite arvukus. Kõige stabiilsem aeroobsete piimhappebakterite arvukus oli proovil FTJ-B12. Selle põhjuseks võib olla starterkultuuri lisamine, mis kohanes paremini kasvukeskkonnaga ning kindlustas stabiilsema fermentatsiooniprotsessi. Gül *et al.* (2005) läbi viidud uuringus oli leivajuuretestes aeroobsete piimhappebakterite arvukus 7,34 log PMÜ/g.

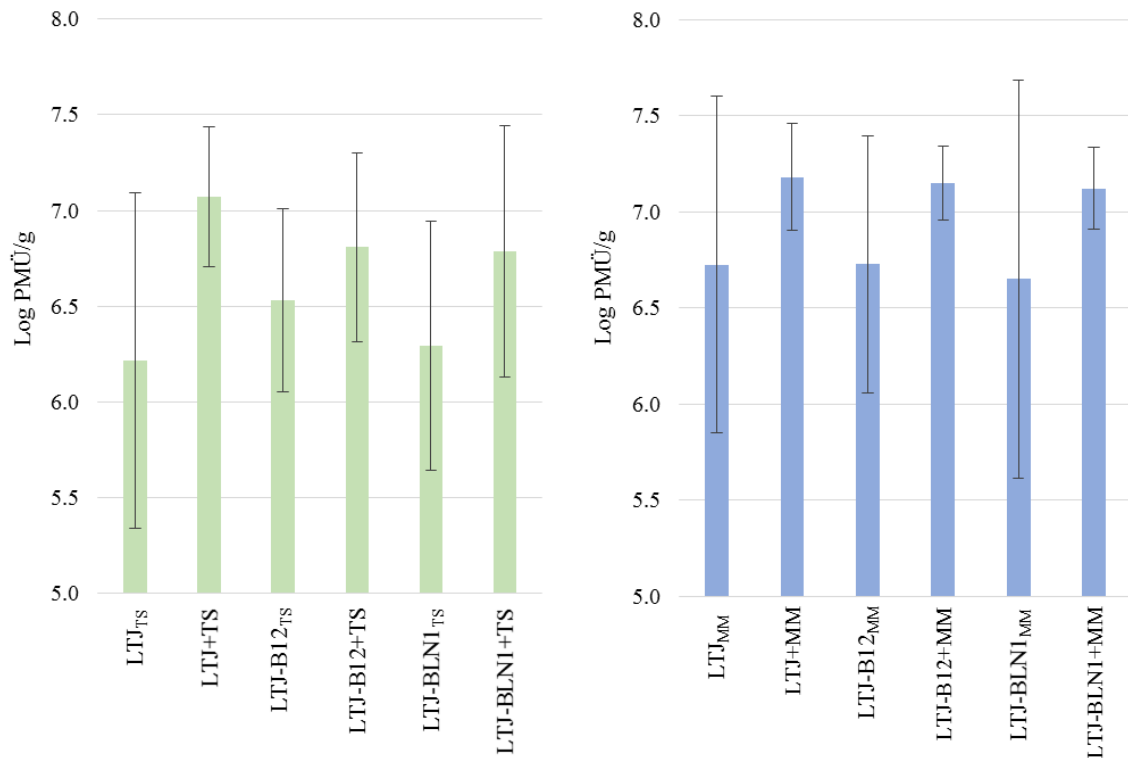


Joonis 7. Aeroobsete piimhappebakterite kasvudünaamika fermenteeritud tatraleivajuuretistes.

Aeroobsete piimhappebakterite üldarvu kadu lüofiliseerimisjärgselt võrreldes tatraleivajuuretiste fermenteeritud proovidega oli kontrollproovides suurem kui proovides, millesse oli lisatud krüoprotektante. Kontrollproovides LTJ_{TS} ja LTJ_{MM} oli kadu vastavalt 11% ja 4%, kontrollproovide LTJ-B12_{TS} ja LTJ-B12_{MM} puhul oli see vastavalt 10% ja 7%, kontrollproovides LTJ-BLN1_{TS} ja LTJ-BLN1_{MM} oli kadu aga vastavalt 11% ja 6%.

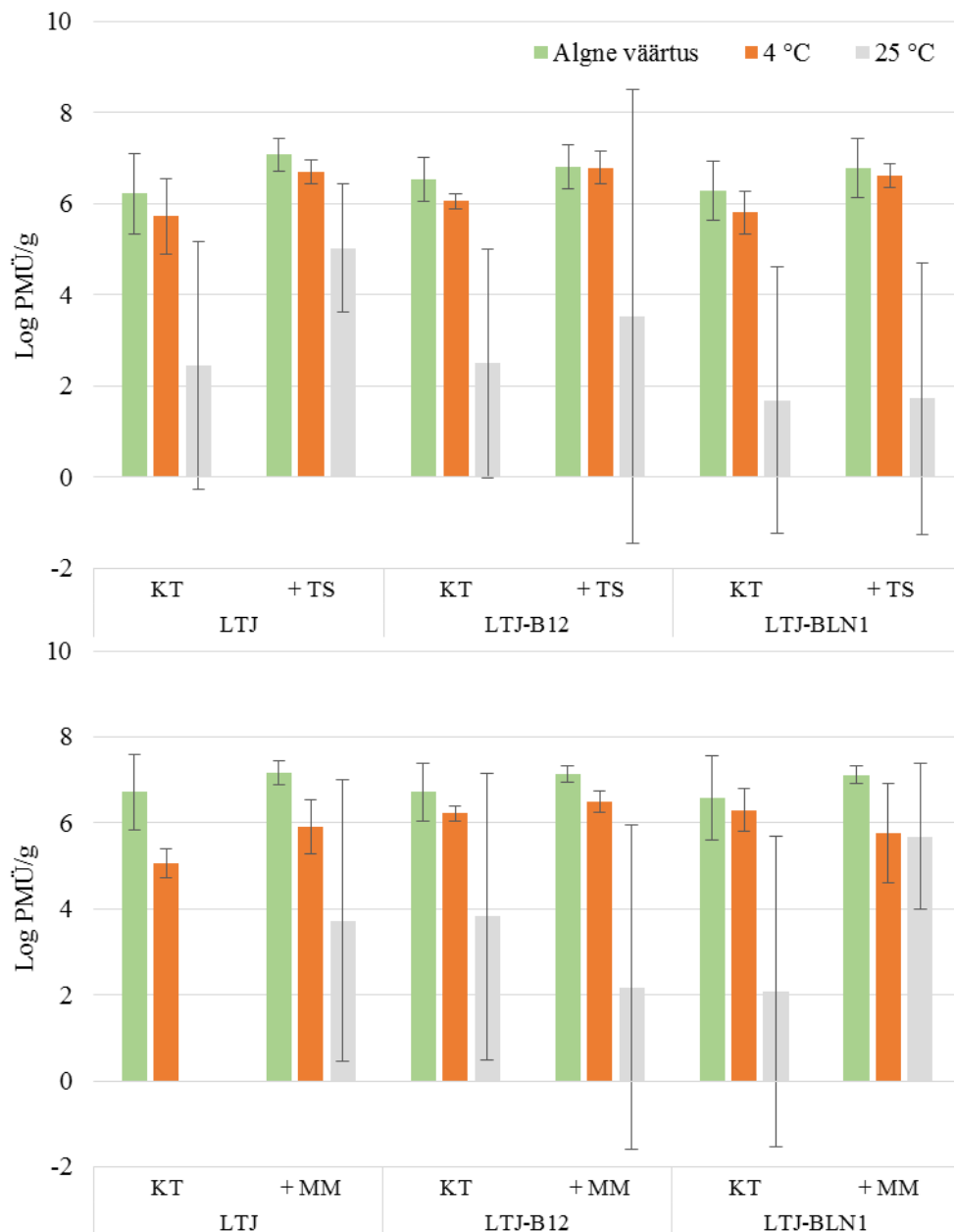
Joonisel 8 nähtub aeroobsete piimhappebakterite keskmise arvukuse erinevus lüofiliseeritud tatraleivajuuretiste kontrollproovides võrreldes krüoprotektantidega proovidega. Sarnaselt eelnevate tulemustega oli lüofiliseeritud kontrollproovides aeroobsete piimhappebakterite keskmine elulemus madalam kui krüoprotektantidega proovides, ehkki kõigi juuretiste puhul olid erinevused statistiliselt mitteolulised ($p > 0,05$). Aeroobsete piimhappebakterite arvukuse keskmise erinevus kontrollproovi keskmisest oli suurem LTJ+TS proovil (0,9 log PMÜ/g) ja LTJ+MM proovil madalam ehk 0,5 log PMÜ/g, mis näitab, et antud tatraleivajuuretise proovidel oli suurem kaitsev toime trehaloosi ja sahharoosiga lüofiliseerimisel. See-eest maltoosi ja maltodekstriini kasutamine lüofiliseerimisel andis tulemuseks kõrgema aeroobsete piimhappebakterite arvukuse keskmiste erinevuse LTJ-B12+MM proovis (0,4 log PMÜ/g) ja mõnevõrra madalam tulemus oli LTJ-B12+TS proovis (0,3 log PMÜ/g). LTJ-BLN1+TS ja LTJ-BLN1+MM korral oli keskmiste erinevus oli võrdne ehk 0,5 log PMÜ/g. Hou *et al.* (2016) leidsid, et 4%-line maltodekstriini doseering

tagas piimhappebakteri *Lactobacillus plantarum*’i parima elulemuse lüofiliseerimisjärgselt. Miao *et al.* (2008) uuringus oli maltoos (doseering 15%) üks parimatest krüoprotektiivsetest ainetest *Lactobacillus rhamnosus* GG elulemuse säilitamiseks.



Joonis 8. Aeroobsete piimhappebakterite üldarvude keskmised ja standardhälbed lüofiliseeritud tatrleivajuuretistes.

Aeroobsete piimhappebakterite arvukused üks kuu säilitatud lüofiliseeritud tatrleivajuuretistes on välja toodud joonisel 9. Tulemustest selgus, et aeroobsed piimhappebakterid säilisid paremini 4 °C juures trehaloosi ja sahharoosi sisaldavates proovides.

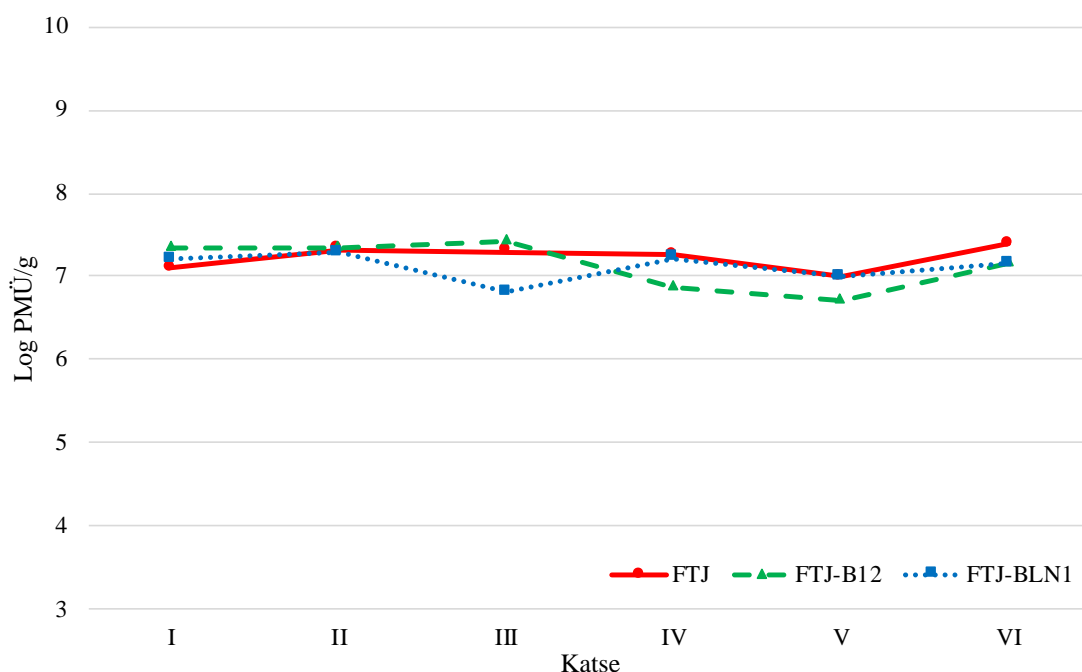


Joonis 9. Aeroobsete piimhappebakterite üldarvude keskmised ja standardhälbed lüofiliseeritud tatrleivajuuretest kontrollproovides (KT) ja krüoprotektanti sisaldavates proovides (+MM või +TS) algselt ja 1 kuu säileaja lõpul.

Temperatuuril 25 °C oli kõrgem elulemus trehaloosi ja sahharoosiga lüofiliseeritud proovides (va. LTJ-BLN1+MM proov). Aeroobsed piimhappebakterid säilisid 25 °C juures hoiustades halvemini võrreldes temperatuuriga 4 °C. LTJ+MM 25 °C juures hoiustatud kontrollproov oli ainus proov, milles aeroobsed piimhappebakterid kaotasid elulemuse.

3.1.3.2. Mikroaeroobsete piimhappebakterite üldarv tatrleivajuuretistes

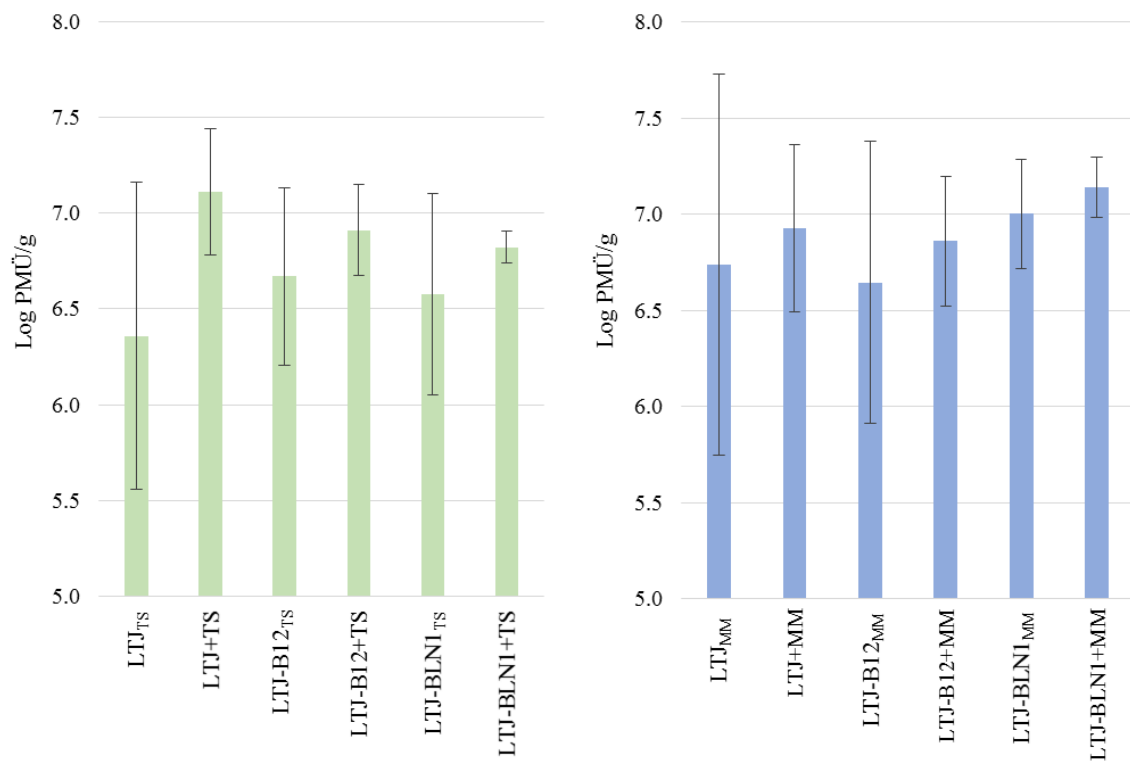
Mikroaeroobsete piimhappebakterite üldarv FTJ proovis oli vahemikus 7,0-7,4 log PMÜ/g, FTJ-B12 proovis varieerus 6,7-7,4 log PMÜ/g ja FTJ-BLN1 oli 6,8-7,3 log PMÜ/g. Starterkultuurideta tatrleivajuuretistes oli mikroaeroobsete piimhappebakterite arvukus kohati kõrgem kui FTJ-B12 ja FTJ-BLN1 proovides. Joonisel 10 on välja toodud fermenteeritud tatrleivajuuretiste mikroaeroobsete piimhappebakterite kasvudünaamika katsete jooksul. Esimesel kahel katsetusel oli tatrleivajuuretiste mikroaeroobsete piimhappebakterite arvukus stabiilne, kolmandal katsetusel langes nende arvukus FTJ-BLN1 proovis. FTJ-B12 proovis langes mikroaeroobsete piimhappebakterite arvukus neljandal katsel. FTJ proovi mikroaeroobsete piimhappebakterite arvukus oli kõige stabiilsem, kuid viimasel katsetusel oli arvukus kõige kõrgem. Syrokou *et al.* (2020) analüüsisid 13 erinevates Kreeka piirkondade kodumajapidamistes valmistatud leivajuuretiste mikroaeroobsete piimhappebakterite arvukust ja leidsid, et need varieerusid vahemikus 7,0-8,36 log PMÜ/g.



Joonis 10. Mikroaeroobsete piimhappebakterite kasvudünaamika fermenteeritud tatrleivajuuretistes.

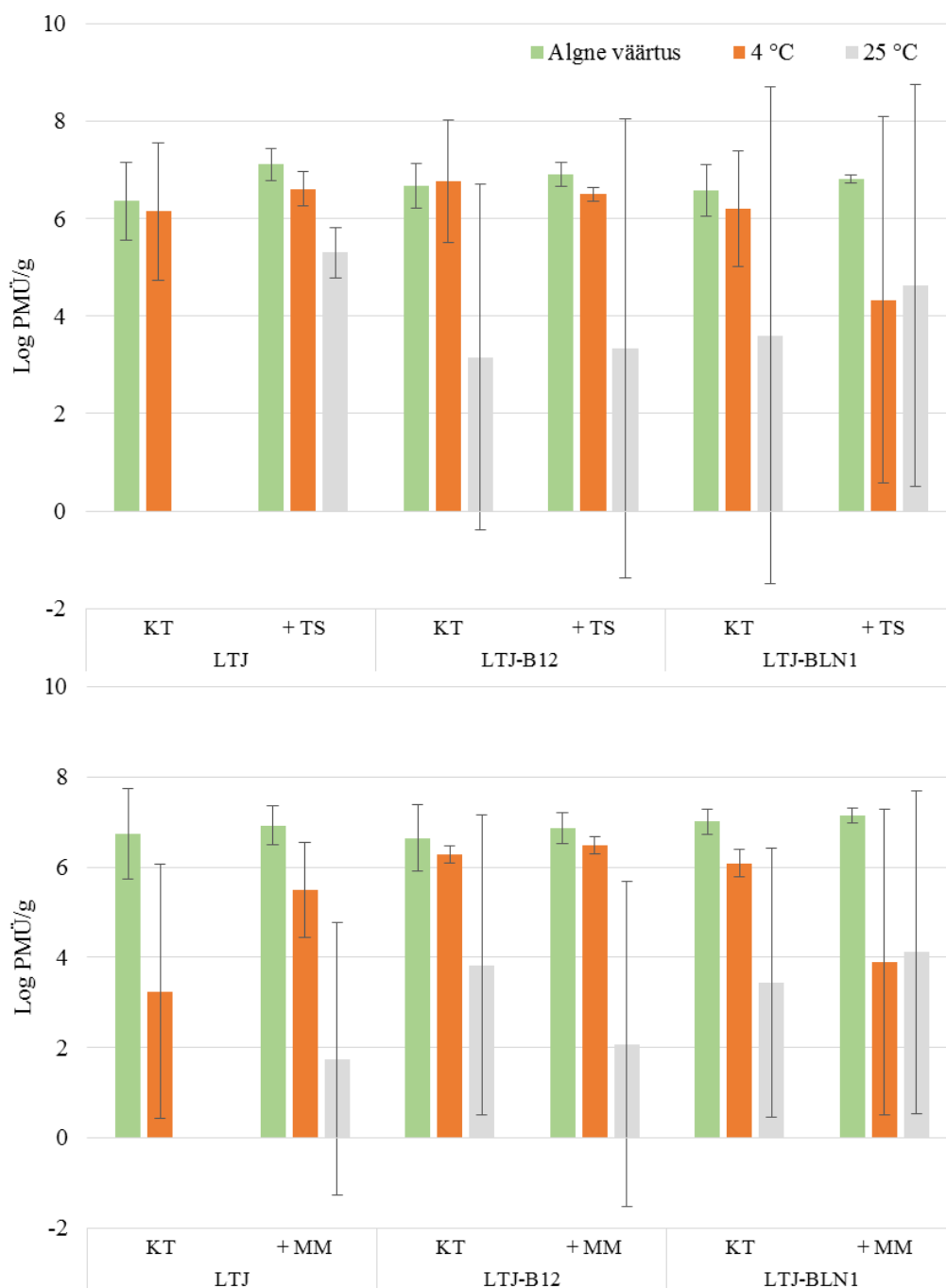
Lüofiliseerimisjärgne kadu mikroaeroobsete piimhappebakterite üldarvus võrreldes tatrleivajuuretiste fermenteeritud proovidega oli kontrollproovides suurem kui proovides, millesse oli lisatud krüoprotektante. Proovis LTJ_{TS} oli kadu 12% ja LTJ_{MM} proovil 7%, LTJ-B12_{TS} kadu oli 7% ja LTJ-B12_{MM} proovil 7%, LTJ-BLN1_{TS} kadu oli 7% ja LTJ-BLN1_{MM} proovil 1%.

Joonisel 11 on välja toodud mikroaeroobsete piimhappebakterite keskmised arvukused lüofiliseeritud tatrleivajuuretistes, kus võrreldakse kontrollproove krüoprotektante sisaldavate proovidega. Lüofiliseeritud tatrleivajuuretiste mikroaeroobsete piimhappebakterite üldarv oli mõnevõrra madalam võrreldes nende proovidega, kuhu lisati krüoprotektante. Erinevused kontrollproovide ja krüoprotektantidega proovide keskmistes üldarvudes olid siiski statistiliselt mitteolulised ($p > 0,05$). Trehaloosi ja sahharoosi kombinatsioon tagas tatrleivajuuretistes esinevatele mikroaeroobsetele piimhappebakteritele kõrgema kaitse. Kontrollprooviga võrreldes oli LTJ+TS puhul erinevus mikroaeroobsete piimhappebakterite arvukuse keskmistes 0,8 log PMÜ/g, LTJ-BLN1+TS proovil 0,2 log PMÜ/g. Maltoosi ja maltodekstriini kooslus andis madalamad mikroaeroobsete piimhappebakterite arvukuse keskmiste erinevused, kus LTJ+MM puhul oli see 0,2 log PMÜ/g ja LTJ-BLN1+MM puhul 0,1 log PMÜ/g. LTJ-B12+TS ja LTJ-B12+MM puhul olid arvukuse keskmiste erinevused võrdselt 0,2 log PMÜ/g.



Joonis 11. Mikroaerobsete piimhappebakterite üldarvude keskmised ja standardhälbed lüofiliseeritud tatralaivajuuretestes.

Jooniselt 12 nähtub mikroaerobsete piimhappebakterite üldarvukuse muutused lüofiliseeritud tatralaivajuuretestes ühe kuu säileaja jooksul.

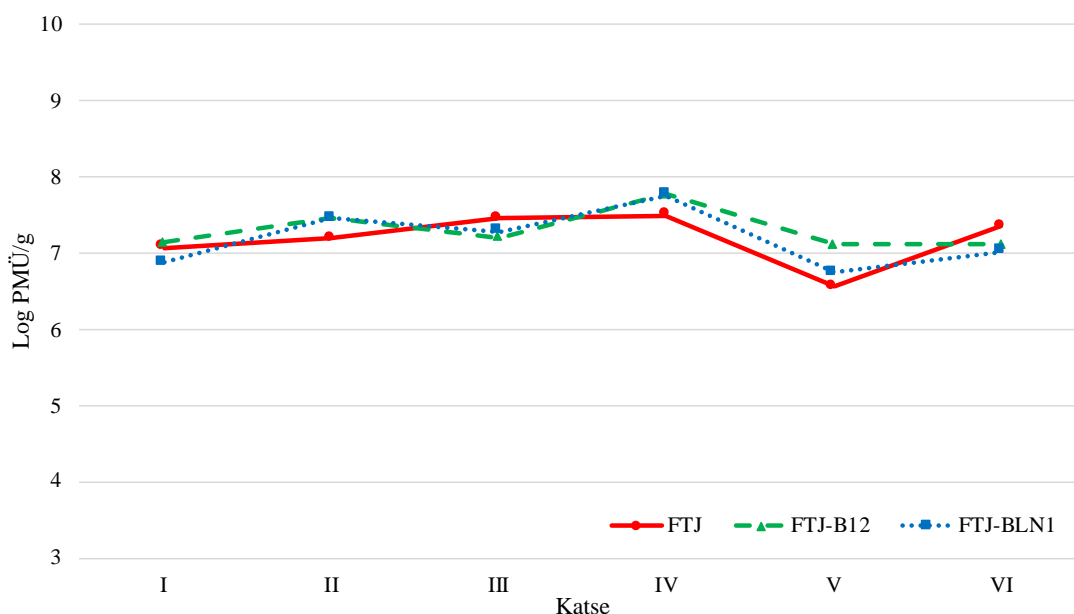


Joonis 12. Mikroaeroobsete piimhappebakterite üldarvude keskmised ja standardhälbed lüofiliseeritud tatraleivajuuretest kontrollproovides (KT) ja krüoprotektanti sisaldavates proovides (+MM või +TS) algselt ja 1 kuu säileaja lõpul.

Kõrgem mikroaeroobsete piimhappebakterite keskmine arvukus oli nendes proovides, mille lüofiliseerimisel kasutati krüoprotektantidena trehaloosi ja sahharoosi. Mikroaeroobseid piimhappebaktereid ei esinenud kontrollproovides LTJ_{TS} ja LTJ_{MM} temperatuuril 25 °C.

3.1.3.3. Anaeroobsete piimhappebakterite üldarv tatrалеivajuuretistes

Anaeroobsete piimhappebakterite keskmine üldarv FTJ proovis oli vahemikus 6,3-7,8 log PMÜ/g, FTJ-B12 korral 6,7-7,8 log PMÜ/g ning FTJ-BLN1 anaeroobsete piimhappebakterite keskmine arvukus varieerus 6,7-7,8 log PMÜ/g. Kirjanduse andmetel on anaeroobsete piimhappebakterite arvukus fermenteeritud leivajuuretistes 8,7-9,64 log PMÜ/g (Gallia *et al.* 2019: 12; Moroni *et al.* 2012: 661). Antud kirjandusallikate tulemused on kõrgemad kui bakalaureusetöö tulemused. Selle põhjuseks võib olla erinev tooraine ja selle algne mikroobide arvukus, erinevused juuretise värskendamise sageduses (Gallia *et al.* 2019 uuringus uuendati iga 6 h ja 24 h tagant, Moroni *et al.* 2012 teadusuuringus uuendati iga 12 h tagant) ja fermentatsiooni läbiviimise temperatuur (Gallia *et al.* 2019 uuringus fermenteeriti juuretist temperatuuril 30 °C, Moroni *et al.* 2012 uuringus fermenteeriti temperatuuril 35 °C). Joonisel 13 nähtub anaeroobsete piimhappebakterite kasvudünaamika fermenteeritud tatrалеivajuuretistes. Tatrалеivajuuretise dünaamika oli stabiilne, kuid V katsetusel langesid kõigi proovide anaeroobsete piimhappebakterite arvukused.



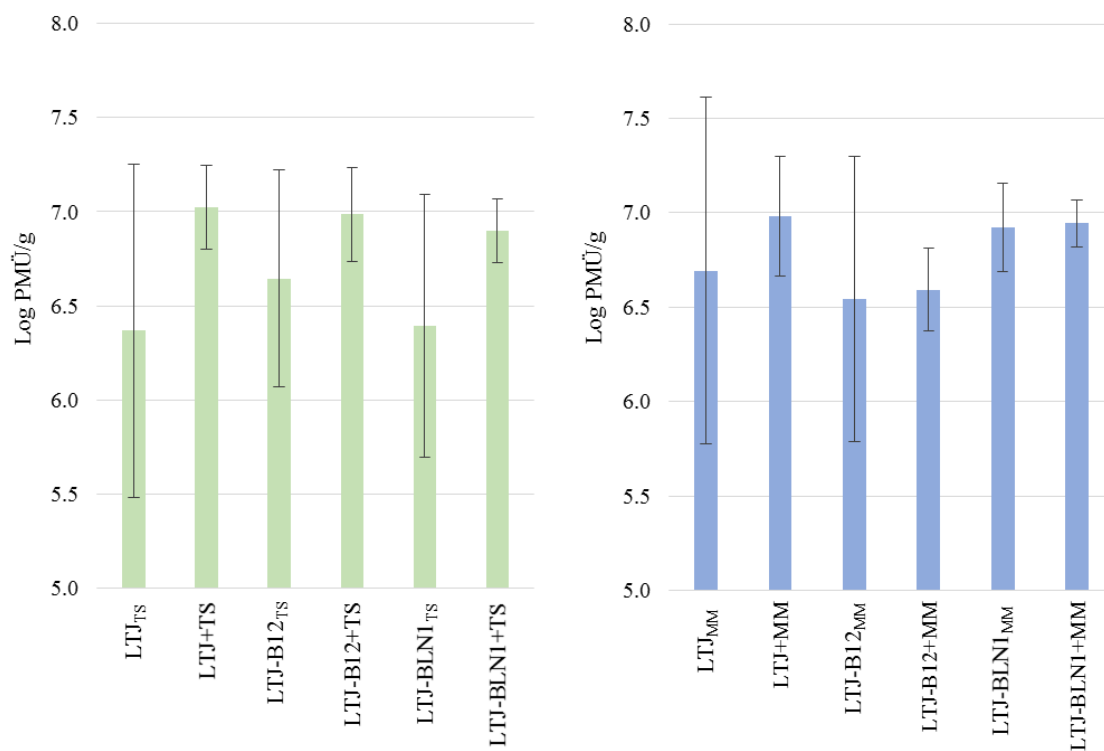
Joonis 13. Anaeroobsete piimhappebakterite kasvudünaamika fermenteeritud tatrалеivajuuretistes.

Lüofiliseerimisjärgne anaeroobsete piimhappebakterite üldarvu kadu võrreldes fermenteeritud tatraleivajuuretestega oli suurim kontrollproovides, kus LTJ_{TS} kadu oli 11% ja LTJ_{MM} proovis 7%, LTJ-B12_{TS} kadu oli 9% ja LTJ-B12_{MM} proovis 10%, LTJ-BLN1_{TS} kadu oli 11% ja LTJ-BLN1_{MM} proovis 4%.

Kontrollproovide ja krüoprotektante sisaldavate proovide anaeroobsete piimhappebakterite arvukuse keskmised lüofiliseeritud tatraleivajuuretestes on välja toodud Joonisel 14. Krüoprotektantidega lüofiliseeritud tatraleivajuureteste anaeroobsete piimhappebakterite elulemus oli kõrgem või võrdne kontrollproovidega. Statistilist erinevust taaskord ei esinenud ($p>0,05$). Caglar *et al.* (2021) leidsid, et anaeroobsete piimhappebakterite arvukus värsketes fermenteeritud leivajuuretestes oli 9,7 log PMÜ/g ning lüofiliseerimisjärgselt oli leivajuuretestes arvukus 8,0 log PMÜ/g ehk arvukuste vahe oli 1,7 log PMÜ/g.

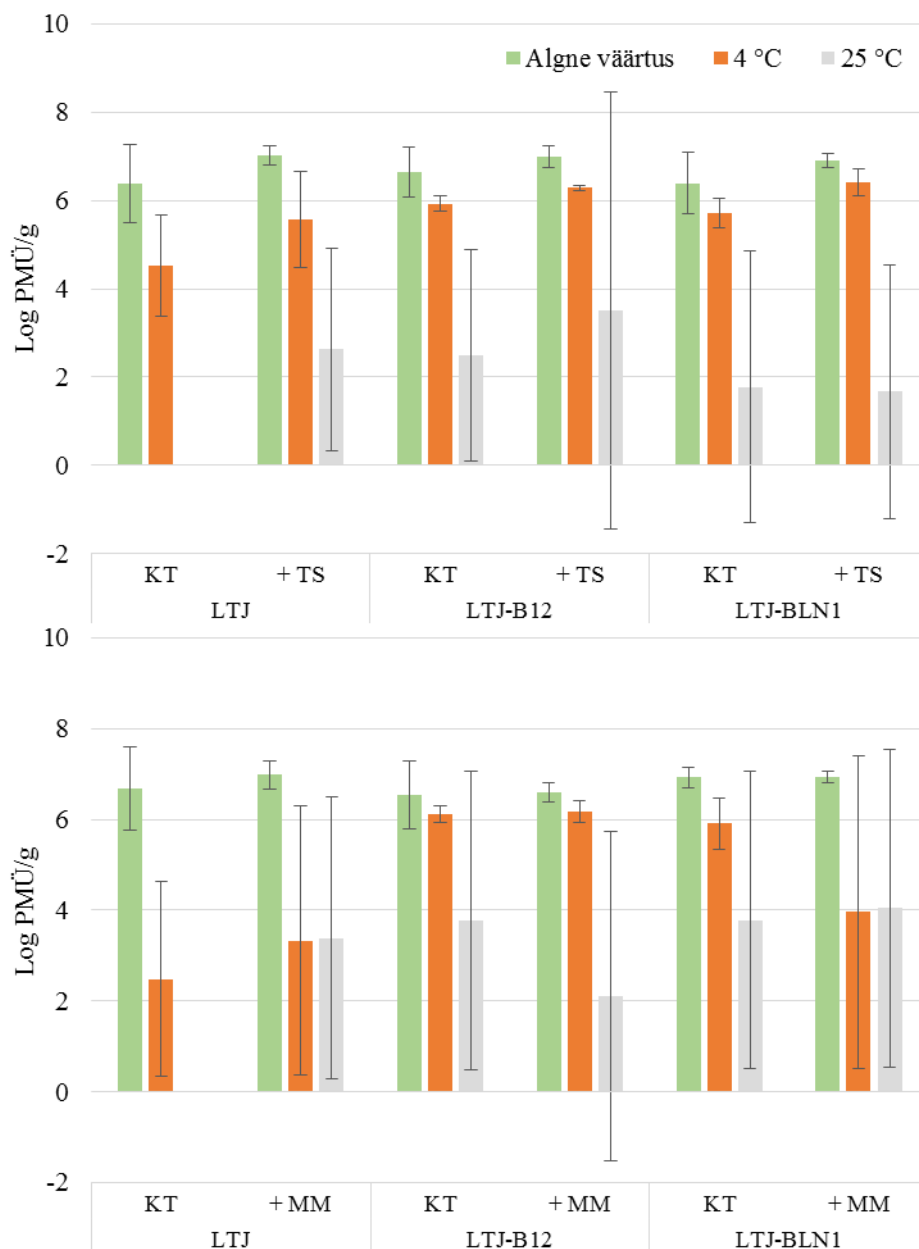
Anaeroobsete piimhappebakterite arvukuse keskmiste erinevused olid kõrgemad trehaloosi ja sahharoosiga lüofiliseeritud proovides. Kontrollprooviga võrreldes oli LTJ+TS proovil keskmiste erinevus 0,7 log PMÜ/g, LTJ-B12+TS proovil 0,3 log PMÜ/g ja LTJ-BLN1+TS korral 0,5 log PMÜ/g. Stefanello *et al.* (2018) leidsid, et lüofiliseerimisel tekkis kõige suurem kadu proovides, kuhu ei lisatud krüoprotektanti trehaloosi (anaeroobsete piimhappebakterite elulemus 67% võrreldes värskes leivajuuretestega). Kõrgem anaeroobsete piimhappebakterite elulemus lüofiliseerimisjärgselt oli proovides, kuhu lisati 10% trehaloosi (elulemus 73%) või 15% trehaloosi sisaldusega proovides (elulemus 81%).

Maltoos ja maltodekstriin tagasid mõnevõrra madalama kaitse, kus LTJ+MM proovi puhul oli arvukuse keskmiste erinevus 0,3 log PMÜ/g, LTJ-B12+MM proovil 0,1 log PMÜ/g ja LTJ-BLN1+MM korral ei olnud erinevus krüoprotektantidega proovidel ja kontrollproovidel.



Joonis 14. Anaeroobsete piimhappebakterite üldarvude keskmised ja standardhälbed lüofiliseeritud tatraleivajuuretistes.

Anaeroobsete piimhappebakterite üldarvude tulemused lüofiliseeritud tatraleivajuuretises ühe kuu säile jooksul on välja toodud Joonisel 15.



Joonis 15. Anaeroobsete piimhappebakterite üldarvude keskmised ja standardhälbed Lüofiliseeritud tatrleivajuuretest kontrollproovides (KT) ja krüoprotektanti sisaldavates proovides (+MM või +TS) algselt ja 1 kuu säileaja lõpul.

Selgus, et 4 °C juures oli kõrgem anaeroobsete piimhappebakterite keskmine arvukus trehaloosi ja sahharoosiga lüofiliseeritud tatrleivajuuretestes, 25 °C juures seevastu maltoosi ja maltodekstriiniga juuretestes. Anaeroobseid piimhappebaktereid ei leitud LTJ_{TS} ja LTJ_{MM} proovides temperatuuril 25 °C.

3.1.5. *Coli*-laadsed tatrалеivajuuretises

Coli-laadsed bakterid puudusid kõikide katsete käigus nii värskest fermenteeritud tatrалеivajuuretistest kui ka lüofiliseeritud tatrалеivajuuretistest. See-eest leidis *coli*-laadseid baktereid tatrалеivajuuretise tooraines toortatrajahus, milles *coli*-laadsete arvukus oli 4,8 log PMÜ/g. *E. coli* on võimeline kasvama pH vahemikus 4,4-10,0, kuid optimaalne pH väärtus on 6-7 (Gullian-Klanian, Sánchez-Solis 2018: 107). Seetõttu pole ka madala happesusega tatrалеivajuuretistes (pH 3,53-4,23) leidunud *coli*-laadseid baktereid.

Clostridium perfringens, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ja *Salmonella* sp. on enterotoksigeensed bakterid, mis võivad sattuda leivajuuretisse selle tootmise, transpordi või turustamise ajal piisava hügieeni puudumise tõttu. Piimhappebakterid konkureerivad tavaliselt teiste mikroorganismidega, moodustades antagonistlikke ühendeid ja modifitseerides metaboliitide abil ümbritsevat keskkonda (Hassan *et al.* 2015: 2-3). Teatud piimhappebakterite tüved, mida sisaldavad leivajuuretised (nt *Lactobacillus bavaricus*, *Lb. sanfrancisco*, *Lb. plantarum*) toodavad antimikroobseid ühendeid, mis võivad aidata leivajuuretises patogeensete organismide (nagu *coli*-laadsete bakterite) kasvu kontrolli all hoida (Simsek *et al.* 2006: 263). Need antimikroobsed ühendid ja seenevastased metaboliidid võib üldjuhul jagada kahte rühma: madala molekulmassiga ühendid ja bakteritsiidid. Piimhappebakterite antimikroobset ja seentevastast toimet fermentatsiooni käigus omistatakse tekkivatele orgaanilistele hapetele (nagu piim-, äädik-, kaproin-, sipelg-, propioon- ja võihape), mille tulemuseks on pH langus (Hassan *et al.* 2015: 2-3).

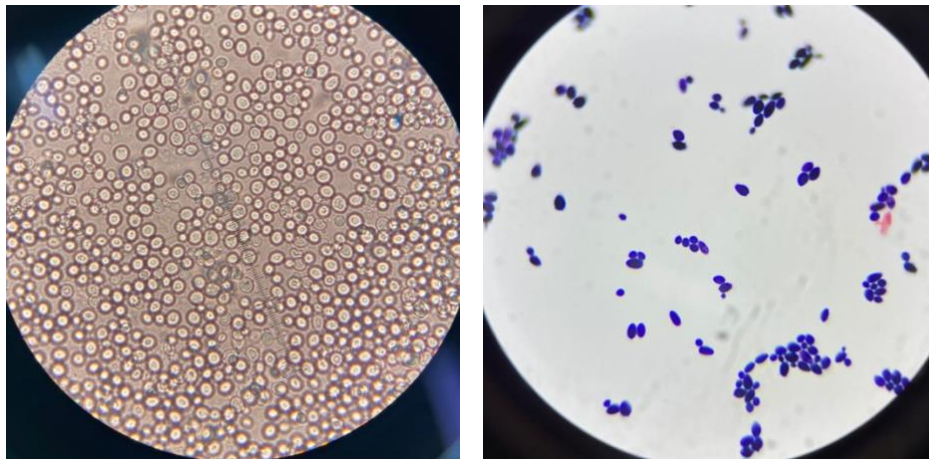
3.1.6. Tatrалеivajuuretistest isoleeritud mikroobid

Tatrалеivajuuretistest ja toortatrajahust isoleeritud mikroobide mikroskopeerimisel tuvastati erineva rakumorfoloogiliste tunnustega mikroobe. Mikroobi isolaatide hulgas esines gram-positiivseid ning gram-negatiivseid pulkbaktereid ja kokke kui ka ovaalse kujuga pärmseeni. Identifitseerimiseks valitud 32 puhaskultuurist tuvastati MALDI-TOF MS meetodil 23 isolaati vastavalt mikroobi liigi või perekonna tasandil.

Saccharomyces perekonda kuuluvad pärmseened, sh *Saccharomyces cerevisiae*, olid domineerivad nii fermenteeritud kui ka lüofiliseeritud tatrалеivajuuretistes (Joonis 16). *Saccharomyces* spp. tuvastati kuuel korral ning *Saccharomyces cerevisiae* liiki tuvastati

kolmel korral. *Saccharomyces* spp. (sh *Saccharomyces cerevisiae*) pesasid isoleeriti nii fermenteeritud tatraleivajuuretisest (FTJ) kui ka lüofiliseeritud tatraleivajuuretisest (LTJ, LTJ-B12, LTJ-BLN1). Selle pärmseene pesad olid heledad kreemjad, suured ja ümarad. Rakud olid ovaalse kujuga, suurus 3x5 µm ning nende asetus oli ebakorrapärane.

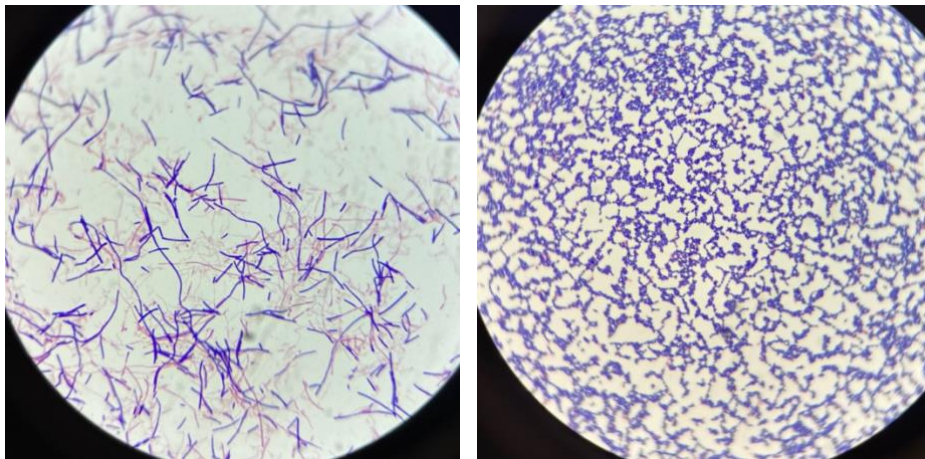
Saccharomyces cerevisiae on leivajuuretisest enim isoleeritud pärmseene liik, mis produtseerib metabolismi käigus alkoholi ja süsihappegaasi. Lisaks on *Saccharomyces cerevisiae* vastupidav ebasoodsatele keskkonnatingimustele, nt. madalale aktiivhappesusele ja osmolaarsusele (Parapouli *et al.* 2020: 1). Tavaliselt satub *Saccharomyces cerevisiae* leivajuuretisest kas pagaripärmi lisamisel või sekundaarse saastumise teel. Teraviljahudes seda pärmseent looduslikult ei leidu (De Vuyst *et al.* 2016: 27).



Joonis 16. Vasakul märgpreparaat ja paremal Grami preparaate *Saccharomyces* spp. (Foto: Irma Laas)

Kahe tatraleivajuuretisest fermenteerimisel kasutati täiendavalt kommertsiaalseid starterkultuure *Lactobacillus fermentum* ja *Leuconostoc mesenteroides*. Neist *Lactobacillus fermentum* isoleeriti lüofiliseeritud tatraleivajuuretisest (LTJ-B12) mikroaeroobses keskkonnas kasvanud MRS pindkülvilt tassilt. Pesad olid beežikad, ümarad ja väikesed. Bakterirakud olid gram-positiivsed pulgakujulised, suurusega 1x4 µm ning paiknesid tihedalt koos. Piimhappebakterit *Leuconostoc mesenteroides* isoleeriti lüofiliseeritud tatraleivajuuretisest (LTJ-BLN1) anaeroobses keskkonnas kasvanud MRS pindkülvilt tassilt. Pesad olid valge värvi, ümarad ja väga väikesed. Rakud olid gram-positiivsed ja ümara kujuga ehk kokid, suuruses 1x1 µm ning asetsesid väga tihedalt kobaras koos.

Piimhappebakterid *Lactobacillus fermentum* ja *Leuconostoc mesenteroides* (Joonis 17) on mesofiilsed, katalaas-negatiivsed ja heterofermentatiivsed bakterid, mis leiavad kasutust paljude fermenteeritud toiduainete tootmisel, sh. leiva tootmisel (Dickson *et al.* 2005: 299; Fuquay 2011: 138). *Lactobacillus fermentum* ja *Leuconostoc mesenteroides* toodavad leivajuuretise fermentatsioonil äädikhapet, piimhapet ja etanooli, mis on olulised metaboliidid leivale iseloomuliku maitse tekkimiseks (Vrancken *et al.* 2008: 61; Bartkiene *et al.* 2020).

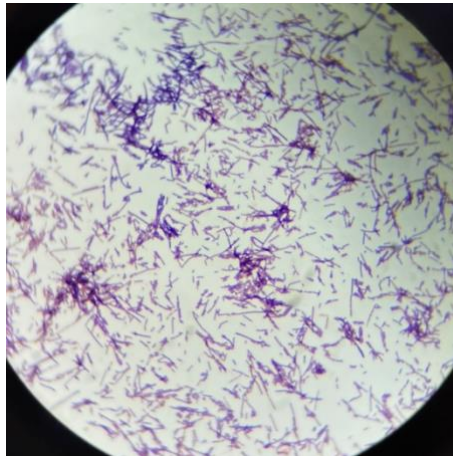


Joonis 17. *Lactobacillus fermentum* (vasakul) ja *Leuconostoc mesenteroides* (paremal) (Foto: Irma Laas).

Fermenteeritud tatrалеivajuuretest identifitseeriti kaks *Lactobacillus* perekonda kuuluvat gram-positiivset pulkbakterit (Joonis 18). *Lactobacillus* spp. identifitseeriti fermenteeritud tatrалеivajuuretest (FTJ) ja lüofiliseeritud tatrалеivajuuretest (LTJ-B12) anaeroobses keskkonnas kasvanud MRS pindkülvi tassidelt. Pesad olid valged, keskelt kõrgemad ja ümarad. Rakud olid pulgakujulised, 1x2 µm suurused, gram-positiivsed ja asetsesid ahelatena. *Lactobacillus* spp. on üks kõige olulisem leivajuuretest mikroobitasse kuuluv perekond, kelle ainevahetuse tulemusena kujuneb leivale iseloomulikud lõhna- ja maitseomadused (Corsetti, Settanni 2007: 539).

Toortatrаjahust isoleeriti *Weissella cibaria*, mis kasvas aeroobses keskkonnas MRS pindkülvi tassidel. Pesad olid ümarad ja beeži värvi. Rakud olid pulgakujulised, gram-positiivsed, suuruselt 0,5x10 µm ning paiknesid tihedalt koos. *Weissella* perekonda kuuluvad bakterid on obliigaatselt heterofermentatiivsed piimhappebakterid ja neid on isoleeritud erinevatest keskkondadest, sealhulgas inimeselt, taimsest toorainest ja fermenteeritud toidust.

(Månberger *et al.* 2020: 1) *Weissella cibaria* on isoleeritud peamiselt tüüp I leivajuuretisest, kuna selle optimaalne kasvutemperatuur on 25-30 °C, kuid ta on võimeline kasvama ka temperatuuridel kuni 45 °C. *Weissella cibaria* sünteesib sukroosist kahte tüüpi homopolüüsahhariide, milleks on glükaanid ja fruktaanid ning moodustab elutegevuse käigus metaboliite, mis parandavad leiva omadusi (nt. teksturaalseid omadusi). (Ricciardi *et al.* 2009: 1528; Di Cagno *et al.* 2006: 9877-9878)



Joonis 18. *Lactobacillus* spp. (Foto: Irma Laas).

Toortatrajahust isoleeriti lisaks mikroobiliike nagu *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas graminis*, fermenteeritud tatrалеivajuuretisest *Bacillus* spp (sh *Bacillus horneckiae*) ja lüofiliseeritud tatrалеivajuuretisest *Micrococcus luteus*. *Bacillus* spp. võis sattuda tatrалеivajuuretisse ristsaastumisel, sest *Bacillus* perekonna bakterid ei arene madala pH-ga keskkonnas (Oshiro *et al.* 2020: 156).

3.2. Füüsikalis-keemiliste analüüside tulemused

Tavaliselt on leivajuuretiste aktiivhappesus vahemikus 3,5-4,5 ning tiitritav happesus 246-268 °Th (Tamani *et al.* 2013: 247), mis on kooskõlas antud bakalaureusetöö tulemustega (Tabel 4). Starterkultuuride lisamine ei mõjutanud aktiivhappesust märkimisväärselt. Tiitritav happesus oli starterkultuurideta fermenteeritud tatrалеivajuuretisel madalam kui starterkultuuridega juuretistel. Moroni *et al.* (2010) uuringus oli tatrалеivajuuretiste aktiivhappesus fermentatsoonaja lõpuks 4,0-4,4, mis on kõrgem tulemus kui antud töös.

Tabel 4. Fermenteeritud tatrалеivajuuretiste füüsikalise-keemilised näitajate kuue katse keskmised väärtused

Analüüsi nimetus	FTJ	FTJ-B12	FTJ-BLN1
Aktiivhappesus (24 h)	3,58	3,53	3,56
Aktiivhappesus (4 h)	4,23	4,18	4,20
Tiitritav happesus	247 °Th	266 °Th	265 °Th
Vee aktiivsus (a_w)	0,973	0,971	0,968
Kuivainesisaldus	46,47%	44,74%	43,50%

Vee aktiivsuse (a_w) väärtus leivajuuretestel jääb kirjanduse andmetel vahemikku 0,96-0,98, kuid see ei piira enamiku saastavate võõrmikroorganismide kasvu (De Vuyst *et al.* 2014: 137). Vee aktiivsuse tulemused olid samuti kooskõlas kirjandusallikaga.

3.3. Tatrалеiva sensoorse hindamise tulemused

Bakalaureusetöös hinnati sensoorselt krüoprotektantide mõju lüofiliseeritud tatrалеivajuuretestega valmistatud tatrалеivale. Tulemustest selgus, et erinevad kommertsiaalsed starterkultuurid (*Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*) ja krüoprotektandid avaldasid mõju tatrалеiva teatud organoleptilistele omadustele.

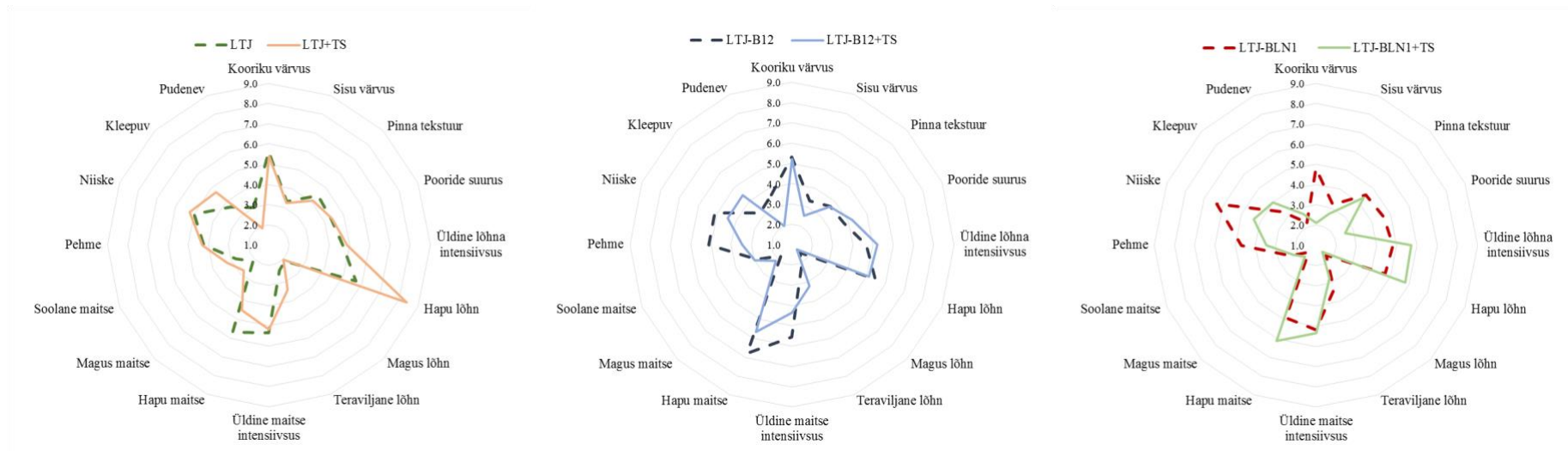
Sensoorsed hindamised viidi läbi kahes osas. Esimesel hindamisel hinnati trehaloosi ja sahharoosi sisaldavate tatrалеivajuuretestega valmistatud leibade sensoorseid omadusi kontrollproovidega (krüoprotektante mittesisaldavad tatrалеivad), milles tulemused on välja toodud Joonisel 19.

LTJ+TS tatrалеiva lõhna hinnati hapumaks (tulemus 8,4 hindepalli) võrreldes LTJ tatrалеivaga (5,7 hindepalli), see-eest LTJ tatrалеiba peeti hapuma maitsega leivaks (5,7 hindepalli) kui LTJ+TS leiba (4,5 hindepalli). Välimuse ehk kooriku ja sisu värvuse, pinna tekstuuri ning pooride suuruse vahel ei esinenud märgatavat erinevust. Kooriku värvust hinnati keskmiselt tumedaks (LTJ leival 5,6 hindepalli, LTJ+TS leival 5,4 hindepalli), sisu värvus see-eest heledaks (LTJ ja LTJ+TS leibadel 3,3 hindepalli).

LTJ-B12 ja LTJ-B12+TS juuretisega valmistatud leibasid hinnati sarnaselt eelnevalt väljatoodud tulemustega, nt. kooriku värvust hinnati keskmiselt tumedaks (LTJ-B12 proovil 5,3 hindepalli, LTJ-B12+TS puhul 5,2 hindepalli) ja sisu värvust heledaks (LTJ-B12 tulemus 3,3 hindepalli ja LTJ-B12+TS 2,6 hindepalli). LTJ-B12 tatraleb oli intensiivsema maitsega (5,6 hindepalli) ja hapum (6,8 hindepalli) kui tatraleb LTJ-B12+TS (intensiivsus 4,3 hindepalli, hapusus 5,7 hindepalli). LTJ-B12 tatraleb peeti pehmemaks (tulemus 5,1 hindepalli) ja niiskemaks (5,1 hindepalli) kui LTJ-B12+TS tatraleb (pehmus 3,4 hindepalli ja niiskus 4,4 hindepalli).

LTJ-BLN1 tatraleb puhul peeti kooriku värvust tumedamaks (4,8 hindepalli) võrreldes LTJ-BLN1+TS tatralebaga (2,1 hindepalli). Samuti pooride suurst hinnati LTJ-BLN1 tatraleb suuremaks (4,7 hindepalli) kui LTJ-BLN1+TS tatraleb (2,6 hindepalli). Lõhna poolest hinnati LTJ-BLN1+TS tatraleb intensiivsemaks (5,7 hindepalli) ja hapumaks (5,8 hindepalli) võrreldes LTJ-BLN1 tatralebaga, mille intensiivsuseks hinnati 4,8 hindepalli ja hapuseks 4,7 hindepalli. Samuti maitset peeti hapumaks LTJ-BLN1+TS tatraleb (6,1 hindepalli) võrreldes kontrollprooviga (4,9 hindepalli).

Kõiki hinnatud tatraleb peeti maitset keskmiselt hapukaks, mille põhjus võib olla fermentatsioonil saavutatud tatralebajuureliste madalast aktiivhappesusest. Samuti peeti tatralebade lõhna hapuks ja mitte magusaks või teraviljaseks, mis tuleneb tatraleb hapust maitsest. Proovide sisu peeti koorikuga võrreldes heledaks. Kooriku värvust mõjutab küpsetamise ajal toimuv Maillardi reaktsioon ning tatraleb maitset ja poorsust mõjutab fermentatsioonil osalevate mikroobide aktiivsus (Paramithiotis *et al.* 2005:2818)



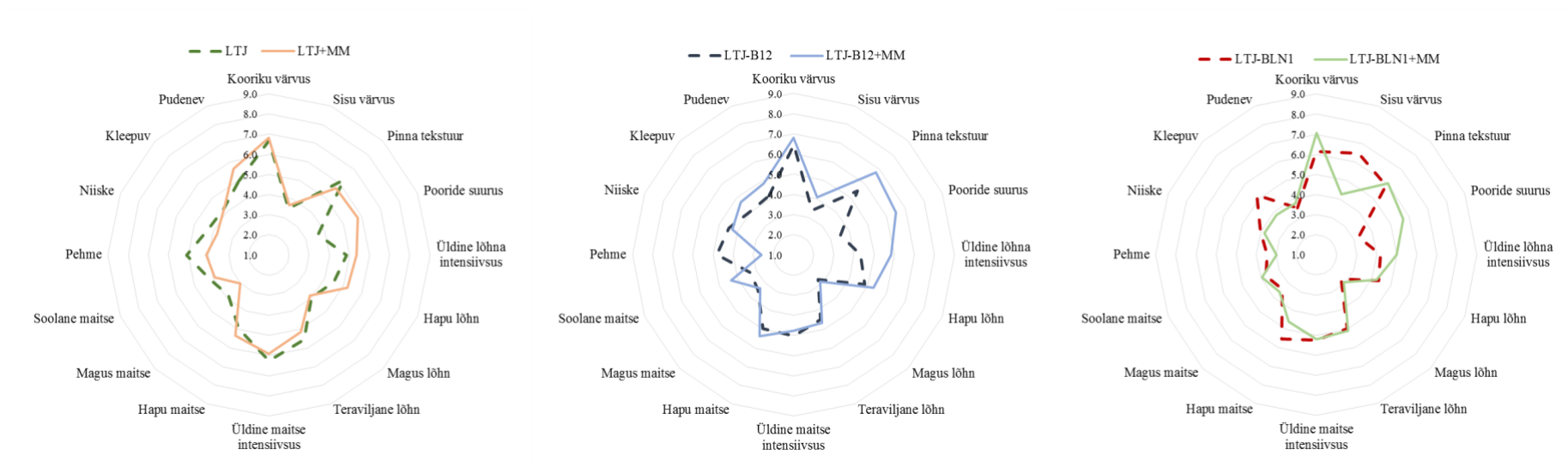
Joonis 19. Lüofiliseeritud tatrleivajuuretisega (krioprotektantide trehaloosi ja sahharoosiga) valmistatud tatrleibade organoleptilise hindamise tulemused.

Teisel sensoorsel hindamisel hinnati proove kõrgemate hinnetega võrreldes esimese hindamise tulemustega (Joonis 20). LTJ ja LTJ+MM tatralebade välimust hinnati samaväärselt, välja arvatud pooride suurus, milles LTJ tatralebade peeti suurema poorsusega prooviks (tulemus 5,8 hindepalli) võrreldes LTJ+MM tatralebaga (3,7 hindepalli). LTJ+MM tatralebade lõhn oli hapum (5,2 hindepalli) kui LTJ tatralebale (4,5 hindepalli) ning maitset peeti ka LTJ+MM tatralebade puhul hapumaks (5,4 hindepalli) kui LTJ tatralebale (5,0 hindepalli).

LTJ-B12+MM tatralebale hinnati pinna tekstuuri krobelisemaks (6,8 hindepalli) ja pooride suurus suuremaks (6,5 hindepalli) kui LTJ-B12 tatralebale (vastavalt 5,5 ja 3,5 hindepalli). Samuti peeti üldist lõhna intensiivsust tugevamaks LTJ-B12+MM leibale (5,9 hindepalli) kui LTJ-B12 tatralebale (4,3 hindepalli). LTJ-B12 ja LTJ-B12+MM leibadeid hinnati keskmiselt hapu maitsega leibadeks, vastavalt 5,0 ja 5,4 hindepalli.

LTJ-BLN1 tatralebade sisu värvust hinnati tumedamaks (6,5 hindepalli) võrreldes LTJ-BLN1+MM tatralebaga (4,3 hindepalli). Seevastu pooride suurus oli suurem LTJ-BLN1+MM tatralebale (5,7 hindepalli) võrreldes kontrollprooviga (3,3 hindepalli). LTJ-BLN1 leiba hinnati maitset hapumaks tatralebaks (5,5 hindepalli) kui LTJ-BLN1+MM (4,6 hindepalli).

Kontrollproovide ja starterkultuuridega valmistatud tatralebade peeti maitset sama hapuks, samuti ei mõjutanud otseselt maltoosi ja maltodekstriini lisamine toote hapusust.



Joonis 20. Lüofiliseeritud tatrалеivajuuretisega (krüoprotektantide maltoosi ja maltodekstriiniga) valmistatud tatrалеibade organoleptilise hindamise tulemused.

Joonisel 21 on välja toodud lüofiliseeritud tatralejauuretistega valmistatud leivad. Proovid 1-6 on valmistatud trehaloosi ja sahharoosi katsetusel, proovid 7-12 maltoosi ja maltodekstriini katsetusel. Kõik tatralejavad on kooriku ja sisemise värvuse poolest sarnased. Visuaalsel vaatlusel ilmneb, et tatralejavad 1, 5, 8 ja 12 on suuremate pooridega. Tatralejavad 5 ja 12 sisaldasid starterkultuuri *Leuconostoc mesenteroides*, mis võis gaasi tekitamise toimel tagada ka õhulisema leiva. Tatralejavad 3, 4, 9 ja 10 on väiksema poorsusega, vaatamata sellele, et antud tatralejauuretised sisaldavad gaasitekitajat *Lactobacillus fermentum*.



Joonis 21. Tatralejavad: 1. LTJ 2. LTJ-B12 3. LTJ-BLN1+TS 4. LTJ-BLN1 5. LTJ+TS 6. LTJ-B12+TS 7. LTJ 8. LTJ+MM 9. LTJ-B12 10. LTJ-B12+MM 11. LTJ-BLN1 12. LTJ BLN1+MM (Fotod: Irma Laas).

KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöös anti kirjandusallikate põhjal ülevaade leivajuuretise mikrobiootast ja selle metabolismist ning kirjeldati külmkuivatamise protsessi olemust ja krüoprotektantide olulisust mikroobide elulemuse parendamisel. Eksperimentaalses osas teostati tatrleivajuuretise fermentatsiooni katsed, mille käigus lisati kahele tatrleivajuuretisele kommertsiaalseid starterkultuure (*Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*). Fermenteeritud tatrleivajuuretiste lüofiliseerimisel kasutati kahte krüoprotektantide kombinatsiooni, millest ühel on kaitsev toime piimhappebakteritele (trehaloos, maltodekstriin) ja teisel pärmseentele (maltoos, sahharoos). Mikroobide elulemust määrati nii fermenteeritud kui lüofiliseeritud tatrleivajuuretistest ning ühe kuu kahel erineval temperatuuril säilinud lüofiliseeritud tatrleivajuuretistest. Lisaks mikrobioloogilistele näitajatele määrati fermenteeritud tatrleivajuuretistest füüsikalis-keemilised näitajad eesmärgiga hinnata fermentatsiooniprotsessi stabiilsust. Kõiki analüüsitud lüofiliseeritud tatrleivajuuretisi kasutati tatrleibade valmistamisel, selleks et sensoorse hindamisega tuvastada kas krüoprotektantide ja kommertsiaalsete starterkultuuride kasutamisel on mõju tatrleiva organoleptilistele näitajatele.

Mikrobioloogilistest analüüsides ilmnes, et fermenteeritud tatrleivajuuretiste mikroobide kasvudünaamika oli katsete jooksul üsna stabiilne, välja arvatud pärmseente kasvudünaamika, kus II katsel oli arvukus kõrgem. Fermenteeritud tatrleivajuuretiste aktiivhappesus oli pärast esmast 24 h kestvat fermentatsiooni vahemikus 3,53-3,56. Pärast teistkordset tatrleivajuuretise uuendamist ning sellele järgnevat 4 h fermentatsiooni oli juuretise aktiivhappesus vahemikus 4,18-4,23 ja tiitritav happesus 247-265 °Th. Vee aktiivsus (a_w) oli tatrleivajuuretistel 0,968-0,973 ja kuivainesisaldus varieerus vahemikus 43,50-46,47%. Starterkultuuride lisamine ei mõjutanud tatrleivajuuretise fermentatsiooniprotsessi suurel määral. Mikroobide arvukused ning füüsikalis-keemilised tulemused olid kooskõlas kirjandusallikatega.

Krüoprotektantidega lüofiliseeritud tatrleivajuuretistes oli katsete jooksul keskmine mikroobide elulemus kõrgem kui proovides, kuhu krüoprotektante ei lisatud, aga keskmiste

erinevused ei olnud statistiliselt olulised. Parima kaitse külmkuivatamise raskete tingimuste üleelamiseks pakkus trehaloosi ja sahharoosi kombinatsioon, mida kinnitavad ka erinevad kirjandusallikad, kus bakteripulbrite või leivajuuretiste külmkuivatamise üleelamiseks on kasutatud nii trehaloosi kui ka sahharoosi. Ühe kuu pikkuse säileaja jooksul oli mikroobide arvukuse säilimiseks optimaalsem temperatuur +4 °C.

Tatralaivajuuretest identifitseeriti enim *Saccharomyces* spp. ja *Lactobacillus* spp. liike. Tuvastamisele saadud 32 isolaadist identifitseeriti *Saccharomomyces* spp (sh *Saccharomyces cerevisiae*) kuus korda. Samuti tuvastati starterkultuuride bakteritüvesid *Lactobacillus fermentum* ja *Leuconostoc mesenteroides* ning kahel korral identifitseeriti *Lactobacillus* spp., kuid liigi nimetust ei suudetud tuvastada. Toortatrajahust identifitseeriti *Weisella cibaria*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas graminis*, fermenteeritud tatralaivajuuretisest *Bacillus* spp. (sh *Bacillus horneckiae*) ja lüofiliseeritud tatralaivajuuretisest *Micrococcus luteus*.

Krüoprotektantide ja starterkultuuride lisamine ei mõjutanud tatralaibade maitset. Tatralaibu peeti keskmiselt hapu maitsega ja lõhnaga leibadeks. Pooride suurus hinnati suuremaks nendel leibadel, mille valmistamisel kasutati krüoprotektante sisaldavaid lüofiliseeritud tatralaivajuuretisi. *Leuconostoc mesenteroides* starterkultuuriga valmistatud tatralaivad olid kohati suurema poorsusega võrreldes teiste tatralaibadega. See-eest *Lactobacillus fermentum*'i lisamine ei mõjutanud tatralaiva pooride suurust.

Kokkuvõtteks, tatralaivajuuretisi on võimalik edukalt külmkuivatada ning kõrgem mikroobide elulemus saavutatakse kasutatades krüoprotektantide trehaloosi ja sahharoosi kooslust. Starterkultuurid ja krüoprotektiivsed ained ei mõjutanud negatiivselt tatralaibade sensoorseid omadusi.

Bakalaureusetöö teostamisel on tekkinud erinevaid mõtteid teema edasiuurimiseks. Tatralaivajuuretise mikrobiootat on vähe uuritud, mistõttu oleks vaja põhjalikumaid uuringuid tatralaivajuuretise mikrobiaalse koosluse kohta. Antud töös MALDI-TOF meetodil ei suudetud kõiki isolaate tuvastada, mistõttu tuleks kasutada ka molekulaarseid meetodeid (nt. sekveneerimist). Lisaks uurida tatralaivajuuretises sisalduvate piimhappebakterite ja pärmseente biokeemilisi ja funktsionaalseid omadusi ja nende mikroobide stabiilsust ajas ehk kui stabiilne on leivajuuretise mikroobne kooslus. Bakalaureusetöös toimus tatralaivajuuretise uuendamine suhteliselt lühikesel perioodil,

mistõttu puuduvad andmed mikrobiota stabiilsuse kohta. Saadav teave on oluline selleks, et optimeerida nii eelkülmutamise ja lüofiliseerimise parameetreid kui ka selleks, et valida sobilikud krüoprotektandid või starterkultuurid. Lisatud starterkultuuride lisamine ei mõjutanud piimhappebakterite arvukust, mis ühelt poolt on positiivne, kuna see tähendab, et lisatud starterkultuurid ei muutunud tatraleivajuuretises domineerivaks, kuid samas tuleks uurida, kuidas lisatud starterkultuurid kohanevad tatraleivajuuretise keskkonna tingimustega.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J., Vinas, I.** (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. – *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 65, pp. 173-182.
- Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Corona, O., Di Gerlando, R., Gaglio, R., Francesca, N., Moschetti, G., Settanni, L.** (2013). Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. – *Food Microbiology*. Vol. 36, pp. 343-354.
- Alvarez-Jubete, L., Auty, M., Arendt, E. K., Gallagher, E.** (2010). Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. – *European Food Research and Technology*. Vol 230, pp. 437–445.
- Arendt, E., Moore, M.** (2006). Bakery Products: Science and Technology: Gluten-free cereal-based products. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing. 575 lk.
- Armstrong, M.J., Hegade, V.S., Robins, G.** (2012). Advances in coeliac disease. – *Current Opinion in Gastroenterology*. Vol 28, pp. 104–112.
- Bartkiene, E., Lele, V., Ruzauskas, M., , Domig, K. J., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Klupsaite, D., Juodeikiene, G., Mickiene, R., Rocha, J. M.** (2020). Lactic Acid Bacteria Isolation from Spontaneous Sourdough and Their Characterization Including Antimicrobial and Antifungal Properties Evaluation. – *Microorganisms*. Vol. 64, pp. 1-20.
- Bircher, L., Geirnaert, A., Hammes, F., Lacroix, C., Schwab, C.** (2018). Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. – *Microbial Biotechnology*. Vol. 11, pp. 721-733.
- Blanco, A., Blanco, G.** (2017). Medical Biochemistry. Elsevier. 826 lk.
- Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F.** (2016). Encyclopedia of food and health. Elsevier. 4006 lk.
- Caglar, N., Ermis, E., Durak, M. Z.** (2021). Spray-dried and freeze-dried sourdough powders: Properties and evaluation of their use in breadmaking. – *Journal of Food Engineering*. Vol. 292, pp. 1-7.
- Cappelle, S., Decock, P.** (2005). Bread technology and sourdough technology. – *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 16, pp. 113-120.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P.** (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. – *International Dairy Journal*. Vol. 14, pp. 835–847.

- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P.** (2003). Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. – *Dairy Science and Technology*. Vol. 83, pp. 203-210.
- Christa K., Soral-Śmietana M.** (2008). Buckwheat grains and buckwheat products – nutritional and prophylactic value of their components – a review. *Czech Journal of Food Sciences*. Vol. 26, pp. 153–162.
- Corsetti, A., Settanni, L.** (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. – *Food Research International*. Vol. 40, pp. 539-558.
- Coulibaly, I., Amenan, A. Y., Lognay, G., Fauconnier, M. L., Thonart, P.** (2009). Survival of Freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* Related to Their Cellular Fatty Acids Composition during Storage. – *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 167, pp. 70-84.
- Daniel, H.-M., Moons, M.-C., Huret, S., Vrancken, G., De Vuyst, L.** (2011). *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. – *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 99, pp. 63-73.
- De Giulio, B., Orlando, P., Barba, G., Coppola, R., De Rosa, M., Sada, A., De Prisco, P. P., Nazzaro, F.** (2005). Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. – *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 21, pp. 739-746.
- De Vuyst, L., Harth, H., Kerrebroeck, S. V., Leroy, F.** (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. – *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 239, pp. 26-34.
- De Vuyst, L., Kerrebroeck, S. V., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.-M., Weckx, S.** (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? – *Food Microbiology*. Vol. 37, pp. 11-29.
- De Vuyst, L., Neysens, P.** (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. – *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 16, pp. 43-56.
- De Vuyst, L., Vancanneyt, M.** (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. – *Food Microbiology*. Vol. 24, pp. 120-127.
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S.** (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. – *Food Microbiology*. Vol. 26, pp. 666-675.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, F., Corsetti, A., Gaenzle, M., Ciatì, R., Gobbetti, M.** (2006). Glucan and Fructan Production by Sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*– *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 54, pp. 9873–9881.

- Dickson, E. M., Riggio, M. P., Macpherson, L.** (2005). A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. – *Journal of Medical Microbiology*. Vol. 54, pp. 299-303.
- Fernstrom, J. D.** (2007). Reducing Salt in Foods. Elsevier. 384 lk.
- Fritz, R.D., Chen, Y.** (2017). Kernel-based gluten contamination of gluten-free oatmeal complicates gluten assessment as it causes binary-like test outcomes. – *International Journal of Food Science & Technology*. Vol 52, pp. 359–365.
- Fuquay, J. W.** (2011). Encyclopedia of Dairy Sciences. Elsevier. 4170 lk.
- Gallia, V., Venturib, M., Pinia, N., Guerrinia, S., Granchia, L., Vincenzinia, M.** (2019). Liquid and firm sourdough fermentation: microbial robustness and interactions during consecutive backslappings. – *LWT - Food Science and Technology*. Vol. 105, pp. 9-15.
- Gao, Y., Janes, M. E., Chaiya, B., Brennan, M. A., Brennan, C. S., Prinyawiwatkul, W.** (2018). Gluten-free bakery and pasta products: prevalence and quality improvement. – *International Journal of Food Science and Technology*. Vol 53, pp. 19–32.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G.** (2008). Gluten-Free Cereal Products and Beverages. San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc. 464 lk.
- Gul, L. B., Con, A. H., Gul, O.** (2020). Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation. – *Cryobiology*. Vol. 96, pp. 122-129.
- Gul, L. B., Gul, O., Yilmaz, M. T., Dertli, E., Con, A. H.** (2020). Optimization of cryoprotectant formulation to enhance the viability of *Lactobacillus brevis* ED25: Determination of storage stability and acidification kinetics in sourdough. – *Journal of Food Processing and Preservation*. Vol. 44, pp. 1-13.
- Gullian-Klanian, M., Sánchez-Solis, M. J.** (2018). Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 on the epicarp of fresh vegetables and fruits. – *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 49, pp. 104-111.
- Guowei, S., Yang, X., Li, C., Huang, D., Lei, Z., He, C.** (2019). Comprehensive optimization of composite cryoprotectant for *Saccharomyces boulardii* during freeze-drying and evaluation of its storage stability. – *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. Vol. 49, pp. 846-857.
- Gül, H., Özçelik, S., Sagdıç, O., Certel, M.** (2005). Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. – *Process Biochemistry*. Vol. 40, pp. 691-697.
- Hassan, Y., I., Zhou, T., Bullerman, L. B.** (2015). Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. – *Food Science and Technology International*. Vol. 22, pp. 1-13.
- Hou, B., Wang, H., Yan, T., Shan, Y., Zhou, W., Zhang, L., Man, C., Deng, Y., Jiang, Y.** (2016). Production for High-vitality Starter Culture of *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 by High Cell-density Cultivation and Low-temperature Vacuum Drying. – *Food Science and Technology Research*. Vol. 22, pp. 519-527.

- Hubalek, Z.** (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. – *Cryobiology*. Vol. 46, pp. 205-229.
- Jakob, F., Ua-Arak, T., Vogel, R.** (2017). Influence of levan-producing acetic acid bacteria on buckwheat-sourdough breads. – *Food Microbiology*. Vol. 65, pp. 95-104.
- Kasper, J. C., Friess, W.** (2011). The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. – *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 78, pp. 248-263.
- Kawasaki, H., Shimanouchi, T., Kimura, Y.** (2019). Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. – *Hindawi*. Pp. 1-14.
- Krkoskova, B., Mrazova, Z.** (2005). Prophylactic components of buckwheat. – *Food Research International*. Vol. 38, pp. 561-568.
- Lacroix, C. and Yildirim, S.** (2007) Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. – *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 18, pp. 176–183.
- Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., Sicard, D.** (2016). Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. – *Food Microbiology*. Vol. 53, pp. 41-50.
- Månberger, A., Verbrugghe, P., Guðmundsdóttir, E. E., Santesson, S., Nilsson, A., Hreggviðsson, G. O., Linares-Pastén, J. A., Karlsson, N. E.** (2020). Taxogenomic assessment and genomic characterisation of *Weissella cibaria* strain 92 able to metabolise oligosaccharides derived from dietary fibres. – *Scientific Reports*. Vol. 10, pp. 1-14.
- Marcus, J. B.** (2019). Aging, Nutrition and Taste. Elsevier. 526 pp..
- Mezaize, S., Chevallier, S., Le-Bail, A., De Lamballerie, M.** (2010). Gluten-free frozen dough: Influence of freezing on dough rheological properties and bread quality. – *Food Research International*. Vol 43, pp. 2186–2192.
- Miao, S., Mills, S., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Roos, Y., Ross, R. P.** (2008). Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. – *Dairy Science & Technology*. Vol. 88, pp. 19-30.
- Morgan, C., Vesey, G.** (2009). Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Academic Press. 4600 lk.
- Moroni, A. V., Arendt, E. K., Bello, F. D.** (2011). Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. – *Food Microbiology*. Vol. 28, pp. 497-502.
- Moroni, A. V., Zannini, E., Sensidoni, G., Arendt, E. K.** (2012). Exploitation of buckwheat sourdough for the production of wheat bread. – *European Food Research and Technology*. Vol. 235, pp. 659–668.

- N'Guessan, F. K., Coulibaly, H. W., Alloue-Borand, M. W. A., Cot, M., Djè, K. M.** (2016). Production of freeze- dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo. – *Food Science & Nutrition*. Vol. 4, pp. 34-41.
- O'Donnell, K., W. Kearsley, M. W.** (2012). *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, Second Edition. Wiley-Blackwell. 504 lk.
- Ojha, K. S., Tiwari, B. K.** (2016). *Novel Food Fermentation Technologies*. Springer International Publishing. 340 lk.
- Oldenhof, H., Woppers, W. F., Fonseca, F., Passot, S., Marin, M.** (2005). Effect of Sucrose and Maltodextrin on the Physical Properties and Survival of Air-Dried *Lactobacillus bulgaricus*: An in Situ Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. – *Biotechnology Process*. Vol. 21, pp. 885-892.
- Oshiro, M., Tanaka, M., Zendo, T., Nakayama, J.** (2020). Impact of pH on succession of sourdough lactic acid bacteria communities and their fermentation properties. – *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. Vol. 39, pp. 152-159.
- Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G.** (2005). Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. – *Process Biochemistry*. Vol. 40, pp. 2813- 2819.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., Hatziloukas, E.** (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. – *AIMS Microbiology*. Vol. 6, pp. 1-31.
- Preziuso, M.** 2016/2017. Preservation of selected sourdough: comparison of freezing, freeze drying, drying and spray drying techniques. Doktoritöö. Molise Ülikooli põllumajanduse, keskkonna ja toiduteaduste osakond. 112 lk.
- Qin, Y.** (2018). *Bioactive Seaweeds for Food Applications*. Elsevier. 320 lk.
- Ricciardi, A., Parente, E., Zotta, T.** (2009). Modelling growth of *Weissella cibaria* as a function of fermentation conditions. – *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 107, pp. 1528–1535.
- Rocha Parra, A.F., Ribotta, P.D., Ferrero, C.** (2015). Apple pomace in gluten-free formulations: effect on rheology and product quality. – *International Journal of Food Science & Technology*. Vol 50, pp. 682–690.
- Rozylo, R., Rudy, S., Krzykowski, A., Dziki, D.** (2014). Novel application of freeze-dried amaranth sourdough in gluten-free bread production. – *Journal of Food Process Engineering*. Vol. 38, pp. 135-143.
- Sensoorse analüüsi käsiraamat. (2018).
- Siaterlis, A., Deepika, G., Charalampopoulos, D.** (2008). Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. – *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 48, pp. 295-301.

- Siepmann, F. B., Ripari, V., Waszczynskyj, N., Spier, M. R.** (2018). Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. – *Food and Bioprocess Technology*. Vol. 11, pp. 242-280.
- Simsek, Ö., Con, A. H., Tulumoglu, S.** (2006). Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. – *Food Control*. Vol. 17, pp. 263-270.
- Stefanello, R. F., Machado, A. A. R., Cavalheiro, C. P., Santos, M. L. B., Nabeshima, E. H., Copetti, M. V., Fries, L. L. M.** (2018). Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried sourdough production. – *LWT - Food Science and Technology*. Vol. 89, pp. 510-517.
- Stefanello, R. F., Nabeshimab, E. H., Iamanakab, B. T., Ludwigc, A., Friesa, L. L. M., Bernardia, A. O., Copetti, M. V.** (2019). Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalous* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. – *Food Research International*. Vol. 115, pp. 90-94.
- Syrokou, M. K., Themeli, C., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Bosnea, L., Argyri, A. A., Chorianopoulos, N. G., Skandamis, P. N., Drosinos, E. H.** (2020). Microbial Ecology of Greek Wheat Sourdoughs, Identified by a Culture-Dependent and a Culture-Independent Approach. – *Foods*. Vol. 1603, pp. 2-20.
- Zayed, G., Roos, Y. H.** (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. – *Process Biochemistry*. Vol. 39, pp. 1081-1086.
- Zhou, W., Therdthai, N., Hui, Y.H.** (2014). Bakery Products Science and Technology: Introduction to baking and bakery products. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 761 lk.
- Takahama, U., Tanaka, M., Hirota, S.** (2011). Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention. Academic Press. 542 lk.
- Tamani, R. J., Goh, K. K. T., Brennan, C. S.** (2013). Psycho-chemical properties of sourdough bread production using selected lactobacilli starter cultures. – *Journal of Food Quality*. Vol. 36, pp. 245-252.
- Torbica, A., Hadnađev, M., Hadnađev, D. T.** (2012). Rice and buckwheat flour characterisation and its relation to cookie quality. – *Food Research International*. Vol. 48, pp. 277- 283.
- Tömösközi, S., Langó, B.** (2017). Gluten-Free Ancient Grains. Woodhead Publishing. 343 lk.
- Vogelmann, S. A., Hertel, C.** (2011). Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. – *Food Microbiology*. Vol. 28, pp. 583-589.
- Vogelmann, S. A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M. J., Hertel, C.** (2009). Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. – *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 130, pp. 205-212.

- Vrancken, G., Rimaux, T., De Vuyst, L., Leroy, F.** (2008). Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem. – *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 128, pp. 58-66.
- Wang, X., Zhao, R., Yuan, W.** (2020). Type I sourdough steamed bread made by retarded spongedough method. – *Food Chemistry*. Vol. 311, pp. 1-11.
- Wieser, H.** (1996). Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. – *Acta Paediatrica*. Vol. 85, pp. 3–9.
- Yağmur, G., Tanguler, H., Leventdurur, S., Elmacı, S. B., Turhan, E. Ü., Francesca, N., Settanni, L., Moschetti, G., Erten, H.** (2016). Identification of Predominant Lactic Acid Bacteria and Yeasts of Turkish Sourdoughs and Selection of Starter Cultures for Liquid Sourdough Production Using Different Flours and Dough Yields. – *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. Vol. 66, pp. 99-107.

LISAD

Lisa 1. Sensoorse analüüsi hindamise leht

Tatralleiva sensoorne hindamine

HINDAMISLEHT

Proov nr

Välimus:

Kooriku värvus	----- -----
	Hele Tume
Sisu värvus	----- -----
	Hele Tume
Pinna tekstuur	----- -----
	Sile Krobeline
Pooride suurus	----- -----
	Väikesed Suured

Lõhn:

Üldine intensiivsus	----- -----
	Vähe intensiivne (0) Väga intensiivne (10)
Hapu	----- -----
	Ei ole hapu (0) Väga hapu (10)
Magus	----- -----
	Ei ole magus (0) Väga magus (10)
Teraviljane	----- -----
	Ei ole teraviljane (0) Teraviljane (10)

Maitse:

Üldine intensiivsus	----- -----
	Vähe intensiivne (0) Väga intensiivne (10)
Hapu	----- -----
	Ei ole hapu (0) Väga hapu (10)
Magus	----- -----
	Ei ole magus (0) Väga magus (10)
Soolane	----- -----
	Mage (0) Soolane (10)

Tekstuur:

Pehmus	----- -----
	Pehme (0) Kõva (10)

Niiskus	<div> <div>Niiske (0)</div> <div>Kuiv (10)</div> </div>
Kleepuvus	<div> <div>Mitte kleepuv (0)</div> <div>Kleepuv (10)</div> </div>
Pudenevus	<div> <div>Mitte pudenev (0)</div> <div>Pudenev (10)</div> </div>

Märkused:

Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Irma Laas,
sünniaeg 18.10.1999

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö

Mikroobide elulemuse hindamine lüofiliseeritud tatrakeivajuuretestes

mille juhendajad on Liis Lutter, Mirjam Vallas,

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____
Allkiri

Tartu, 24.05.2021

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

Liis Lutter
(juhendaja nimi ja allkiri)

24.05.2021
(kuupäev)

Mirjam Vallas
(juhendaja nimi ja allkiri)

24.05.2021
(kuupäev)

